

Bruna Lenfers Turnes

**EFEITO ANALGÉSICO DA TERAPIA POR DÍODO EMISSOR
DE LUZ (830 e 950 nm) NA DOR INFLAMATÓRIA AGUDA E
CRÔNICA: análise dos mecanismos de ação fotobiológicos**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto
Soares dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Daniel
Fernandes Martins

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, por meio do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Turnes, Bruna Lenfers

Efeito analgésico da terapia por díodo emissor de luz (830 e 950 nm) na dor inflamatória aguda e crônica: análise dos mecanismos de ação fotobiológicos/ Bruna Lenfers Turnes; orientador, ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS; coorientador, DANIEL FERNANDES MARTINS. - Florianópolis, SC, 2015. 95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

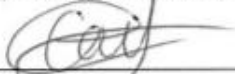
1. Neurociências. 2. Terapia por díodo emissor de luz. 3. Dor crônica. 4. Inflamação. 5. Analgesia. I. DOS SANTOS, ADAIR ROBERTO SOARES. II. MARTINS, DANIEL FERNANDES. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

BRUNA LENFERS TURNES

**“EFEITO ANALGÉSICO DA TERAPIA POR DÍODO
EMISSOR DE LUZ (830 E 950 NM) NA DOR
INFLAMATÓRIA AGUDA E CRÔNICA: ANÁLISE DOS
MECANISMOS DE AÇÃO FOTOBIOLÓGICOS”**


Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2015.

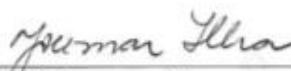


Prof. Rodrigo Bainy Leal
Coordenador do Curso

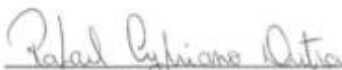
Banca Examinadora:


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC

Prof. Alcir Luiz Dafré
Membro – UFSC



Prof. Jocemar Ilha
Membro externo à UFSC



Prof. Rafael Cypriano Dutra
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e sabedoria de poder lidar com as dificuldades da vida, por ter me dado condições de lutar pelos objetivos pretendidos. Agradeço pela vida e pelas pessoas maravilhosas que fazem parte dela.

A minha família, que apesar de todas as dificuldades, deu-me educação e oportunidade de trilhar essa jornada. Obrigada pelos valores ensinados, pelo constante incentivo e amor incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, pela oportunidade única que me proporcionou de poder realizar este trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins, por todos os ensinamentos, pela paciência, pela generosidade e por acreditar que esse sonho seria possível. Obrigada pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela sua orientação, carinho e apoio.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurociências Experimental (LaNex), pela amizade e incentivo.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram e colaboraram na realização deste objetivo.

Agradeço a vida de todos os animais utilizados neste trabalho e dizer que todas elas contribuíram para um bem maior.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista, o meu muito obrigado!

“Enquanto a fê e a esperança continuarem frequentando nosso coração e brilhando em nosso horizonte, iremos descobrindo que os motivos de nossa corrida terão sentido e validade. A meta pode estar longe, mas é bem visível a olho nu.”

(Pe. Virgílio, ssp)

RESUMO

O emprego terapêutico da luz para o tratamento de diversas condições de saúde, conhecido como “fototerapia”, é uma das modalidades terapêuticas conhecidas mais antigas. Durante as últimas décadas, a terapia por díodo emissor de luz (do inglês *Light-Emitting Diode Therapy* – LEDT), uma forma de fototerapia que utiliza como fonte de irradiação os LEDs, vem sendo empregada clinicamente. A terapia promove uma sequência de eventos intracelulares, que resulta em uma série de efeitos fisiológicos essenciais para a resolução do processo inflamatório, cicatrização tecidual e analgesia. No entanto, os dados científicos sobre os possíveis mecanismos fotobiológicos e moleculares responsáveis pelo efeito terapêutico da LEDT ainda são insuficientes. Deste modo, este trabalho pretende elucidar alguns dos mecanismos fotobiológicos envolvidos no efeito terapêutico da LEDT, avaliando sua ação anti-hiperalgésica, anti-inflamatória e antioxidante em um modelo de hiperalgisia inflamatória crônica em camundongos. Os camundongos foram submetidos ao modelo de dor inflamatória crônica induzida por injeção intraplantar (i.pl.) do adjuvante completo de Freund (CFA). Após 24 horas, os animais foram tratados com a LEDT em dois comprimentos de onda, 830 ou 950 nm e com diferentes fluências (1, 2 e 4 J/cm²). Em comparação com o grupo controle (CFA), a LEDT (830 ou 950 nm) reduziu a hiperalgisia mecânica avaliada por meio do filamento de von Frey (0,4 g), porém não reduziu a hiperalgisia térmica ao calor avaliada pela placa quente (48 °C). O efeito analgésico da LEDT 830 ou 950 nm envolveu a ativação de receptores opioides periféricos e o recrutamento de leucócitos contendo opioides para o sítio inflamado, tendo em vista que a naloxona (antagonista opioide) e fucoidina (inibidor da migração de leucócitos) reduziram o seu efeito analgésico. Além disso, a analgesia da LEDT também foi dependente do efeito antioxidante, diminuindo a concentração de marcador de estresse oxidativo (peroxidação lipídica) e restabelecendo o sistema antioxidante enzimático (enzima superóxido dismutase). A LEDT 830 nm também reduziu o edema e a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , sugerindo um efeito anti-inflamatório. Ademais, a LEDT 830 nm reduziu a hiperalgisia mecânica causada pela histamina e IGF-1 e também o aumento da concentração de IGF-1 na pata causado pelo CFA, confirmando o envolvimento de receptores de histamina e de IGF-1 no seu efeito. A LEDT 950 nm também reduziu a hiperalgisia mecânica induzida por histamina. Em síntese, os resultados apresentados neste trabalho elucidam alguns dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no efeito terapêutico da LEDT

e atestam a favor da sua utilização para o tratamento de quadros álgicos de etiologia inflamatória.

Palavras-chave: Terapia por díodo emissor de luz. Dor crônica. Inflamação. Analgesia.

ABSTRACT

The therapeutic use of light for treating various health conditions, known as "light therapy", is one of the oldest known therapeutic modalities. During the last decades, the Light-Emitting Diode Therapy (LEDT), a form of phototherapy that uses as a source of irradiation LEDs, has been used clinically. The therapy promotes a sequence of intracellular events that result in a number of essential physiological effects, such resolution of the inflammatory process, tissue healing and analgesia. However, scientific data on the possible photobiological and molecular mechanisms responsible for the therapeutic effect of LEDT are still insufficient. Thus, this study aims to elucidate some of the photobiological mechanisms involved in the therapeutic effect of LEDT, evaluating their anti-hyperalgesic, anti-inflammatory and antioxidant action in a model of chronic inflammatory hyperalgesia in mice. The mice were subjected to chronic inflammatory pain model induced by intraplantar injection (i.pl.) of complete Freund's adjuvant (CFA). After 24 hours, the animals were treated with LEDT in two wavelengths 830 or 950 nm and different fluences (1, 2 and 4 J / cm²). In comparison with the control group (CFA), the LEDT (830 or 950 nm) reduced the mechanical hyperalgesia evaluated by the von Frey filament (0.4g), but did not reduce the thermal hyperalgesia heat evaluated by the hot plate (48° C). The analgesic effect of 830 or 950 nm LEDT involved the activation of the peripheral opioid receptors and opioid leukocyte recruitment to the inflamed site in order that naloxone (opioid antagonist) and fucoidan (leukocyte migration inhibitory) reduced analgesic effect of LEDT. In addition, LEDT analgesia was also dependent antioxidant effect, decreasing the concentration of marker of oxidative stress (lipid peroxidation) and reinstating the enzymatic antioxidant system (superoxide dismutase). The 830 nm LEDT also reduced the edema and the concentration of proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , suggesting an anti-inflammatory effect. Furthermore, the 830 nm LEDT reduced mechanical hyperalgesia caused by histamine and also IGF-1 and increased IGF-1 concentration caused by the CFA in the paw, confirming the involvement of histamine and IGF-1 receptors in their effect. The 950 nm LEDT also reduced the mechanical hyperalgesia induced by histamine. In summary, the results presented here elucidates some of the neurobiological mechanisms involved in the therapeutic effect of LEDT and testify in favor of its use for the treatment of pain conditions of inflammatory etiology.

Keywords: Light-Emitting Diode Therapy. Chronic pain. Inflammation. Analgesia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Influência de substâncias liberadas por células inflamatórias na nocicepção periférica.....	19
Figura 2 - Profundidade de penetração x comprimento de onda.....	37
Figura 3 - Efeito da LEDT 830 nm na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA.....	48
Figura 4 - Efeito da LEDT 950 nm na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA.....	50
Figura 5 - Efeito da LEDT na hiperalgesia térmica ao calor induzida pela injeção i.pl. de CFA.....	51
Figura 6 - Efeito da LEDT no edema de pata induzido por injeção i.pl. de CFA.....	52
Figura 7 - Envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico da LEDT	53
Figura 8 - Envolvimento de opioides liberados por leucócitos no efeito anti-hiperalgésico da LEDT	54
Figura 9 - Envolvimento de mastócitos na inflamação induzida por injeção i.pl. de CFA	55
Figura 10 - Efeito da LEDT na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de histamina.....	56
Figura 11 - Efeito da LEDT sobre citocinas pró-inflamatórias.....	57
Figura 12 - Efeito da LEDT sobre os níveis de IGF-1	58
Figura 13 - Efeito da LEDT na hiperalgesia mecânica induzida injeção i.pl. por IGF-1	59
Figura 14 - Efeito da LEDT no dano oxidativo	60
Figura 15 - Efeito da LEDT no sistema antioxidante	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HT – Serotonina
AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPC – Monofosfato cíclico de adenosina
AP-1 – Proteína ativadora-1
ATP – Trifosfato de adenosina
CaMK – Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina
CAT – Catalase
CCL – Quimiocina
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA – Adjuvante completo de Freund
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX – Ciclooxigenase
DAG – Diacilglicerol
DRG – Gânglio da raiz dorsal
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ENI – Esmagamento do nervo isquiático
EPM – Erro padrão da média
ERO – Espécie reativa de oxigênio
FDA – *Food and Drug Administration*
FTC β – Fator de crescimento transformante beta
GABA – Ácido γ -aminobutírico
i.pl. – Intraplantar
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
IFN – Interferon
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IL – Interleucina
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina-6
IP – Incisão plantar
IP3 – Trifosfato de inositol
J – Joules
LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
LED – Díodo emissor de luz
LEDT – *Light-emitting diode therapy*
LLLTT – *Low Level Laser Therapy*
L-NAME – L-NG-Nitroarginina Metil Ester
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno
MDA – Malondialdeído
MIA – Morte indolor assistida

mW/cm² – Miliwatts por centímetro quadrado
NASA – *National Aeronautics and Space Administration*
NF-κB – Fator de transcrição nuclear kappa B
NGF – Fator de crescimento do nervo
NMR – Núcleo magno da rafe
NO – Óxido nítrico
PAF – Fator de ativação plaquetária
PAG – Substância cinzenta periaquedutal
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PK – Proteína cinase
PKA – Proteína cinase A
PKC – Proteína cinase C
PLA₂ – Fosfolipase A₂
RVM – Bulbo ventromedial rostral
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SOD – Superóxido dismutase
SP – Substância P
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF – Fator de necrose tumoral
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
TRPA1 – Receptor de potencial transiente ankyrin 1
TRPV1 – Receptor vaniloide de potencial transitório 1
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 ANIMAIS.....	40
4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA ...	40
4.3 APLICAÇÃO DA LEDT E GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	41
4.4.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	41
4.4.2 Avaliação da hiperalgesia térmica.....	42
4.4.3 Avaliação do edema	42
4.5 ANÁLISE DO MECANISMO FOTOBIOLÓGICO DO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA LEDT	42
4.5.2 Avaliação da participação de leucócitos	43
4.5.3 Avaliação da participação de mastócitos	43
4.5.4 Hiperalgesia mecânica induzida por histamina	44
4.5.5 Hiperalgesia mecânica induzida por IGF-1.....	44
4.6 COLETA PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	44
4.7 ENSAIO POR IMUNOABSORBÂNCIA LIGADO À ENZIMA (ELISA).....	45
4.8 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	45
4.8.1 Análise de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS	45
4.8.2 Quantificação da atividade das enzimas antioxidantes	46
4.8.3 Determinação de proteínas totais	46
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 EFEITO DA LEDT 830 nm NA HIPERALGESIA MECÂNICA..	47
5.2 EFEITO DA LEDT 950 nm NA HIPERALGESIA MECÂNICA..	48

5.3 EFEITO DA LEDT NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR	50
5.4 EFEITO DA LEDT NO EDEMA DE PATA	51
5.5 ANÁLISE DO MECANISMO FOTOBIOLÓGICO DA LEDT	52
5.5.1 Envolvimento dos receptores opioides.....	52
5.5.2 Envolvimento de opioides liberados por leucócitos.....	53
5.5.3 Envolvimento de mastócitos	54
5.5.4 Efeito da LEDT na hiperalgesia mecanica induzida pela histamina	55
5.6 EFEITO DA LEDT NAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	56
5.7 EFEITO DA LEDT SOBRE OS NIVEIS DE IGF-1	57
5.8 EFEITO DA LEDT NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR IGF-1	58
5.9 EFEITO DA LEDT NO DANO OXIDATIVO	59
5.10 EFEITO DA LEDT NO SISTEMA ANTIOXIDANTE	60
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	72

1 INTRODUÇÃO

A dor crônica é considerada uma condição debilitante e apresenta um devastador impacto socioeconômico e sobre a qualidade de vida. De acordo com o relatório publicado pelo *Institute of Medicine of the National Academies*, a dor crônica afeta em torno de 100 milhões de americanos, mais do que o total de indivíduos que sofrem de diabetes, doenças cardíacas e câncer. Embora as sensações dolorosas sejam um aviso do qual o organismo emprega para sinalizar um processo de agressão, a problemática da dor acompanha a humanidade na medida em que interfere na homeostase do indivíduo (PIRES, 2007). A dor crônica é causada por múltiplos fatores e seus sintomas afetam a qualidade de vida e prejudicam as atividades diárias dos acometidos. O número alarmante de casos fez com que as autoridades de saúde considerassem esta como sendo a década da dor. No Brasil há pouca informação a respeito desse problema, todavia, sabe-se que a dor crônica acomete milhões de pessoas. Desta forma, foi estabelecida a necessidade da dor ser reconhecida como o 5º sinal vital pela Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED, 2013).

É de fundamental importância o conhecimento acerca dos mecanismos patofisiológicos envolvidos no desenvolvimento e manutenção de patologias diversas, assim como a compreensão do mecanismo neurobiológico das terapias utilizadas no tratamento de cada uma delas. Deste modo, buscou-se investigar os mecanismos envolvidos na dor inflamatória crônica induzida pela injeção intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos, assim como os mecanismos fotobiológicos envolvidos no efeito anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e antioxidante da Terapia por Díodo Emissor de Luz (do inglês *Light-Emitting Diode Therapy – LEDT*).

O emprego terapêutico da luz para o tratamento de diversas condições de saúde, conhecido como “fototerapia”, é uma das mais antigas modalidades terapêuticas conhecidas. As primeiras descrições do uso da fototerapia datam do ano de 1400 pelos hindus, que utilizavam plantas medicinais associadas à exposição a luz solar no tratamento de afecções cutâneas. Porém, somente a partir do início do século XX que a fototerapia começou a ser realmente estudada e praticada (ROELANDTS, 2002).

A partir de pesquisas iniciais com fontes artificiais de luz, a terapia com laser de baixa intensidade (LLLT), realizada com diodos de LED ou LASER (do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of*

Radiation), passou a ser intensamente pesquisada e hoje é amplamente utilizada, especialmente em dermatologia e fisioterapia, com inúmeras aplicações terapêuticas (MELIS; DI GIOSIA; ZAWAWI, 2012).

A LEDT apresenta diversos efeitos terapêuticos significativos, os quais qualificam o seu uso na clínica. Em certos comprimentos de onda, como no vermelho e infravermelho (600-1200 nm), influencia desde a cicatrização de tecidos até a modulação da transmissão dolorosa (EELLS et al., 2004).

Além dos efeitos terapêuticos, a LEDT tem sido demonstrada como uma terapia segura, não invasiva, de baixo custo e bem tolerada por pacientes de ambos os sexos e de todas as idades (PARK et al., 2013), não sendo encontrados relatos na literatura de efeitos colaterais (BAROLET, 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este tópico compõe-se da evolução do tema e ideias de diferentes autores sobre os assuntos mais relevantes para a compreensão do trabalho.

2.1 DOR INFLAMATÓRIA

Durante o processo inflamatório, a dor é tipicamente o sintoma mais persistente e quando passa a se repetir ou sustentar-se por um período prolongado, deixa de apresentar vantagens biológicas e passa a causar apenas sofrimento. Ou seja, alterações na via da dor podem levar à hipersensibilidade, fazendo com que seu caráter frequentemente protetor seja perdido. Nesses casos, em vez de aguda, a dor pode se tornar crônica e debilitante (JULIUS; BASBAUM, 2001), a qual é desencadeada por impulsos de pequena intensidade gerados por atividade neural anormal (MELZACK; WALL, 1999; MOFFAT; ERA, 2011). Nessas ocasiões, comumente ocorre um quadro de hipersensibilidade ocasionada pela ativação e sensibilização de nociceptores periféricos e mediadores químicos produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação (DRAY; URBAN; DICKENSON, 1994; RADU et al., 2013). Esse quadro leva a diminuição do limiar e amplificação da resposta dos nociceptores que inervam o tecido inflamado (sensibilização periférica). Além dessas alterações periféricas, pode também ocorrer uma resposta aumentada dos neurônios nociceptivos no SNC pelos estímulos aferentes normais ou sublimiares (sensibilização central) (SCHOLZ; WOOLF, 2002; LOESER; TREEDE, 2008; WOOLF, 2010).

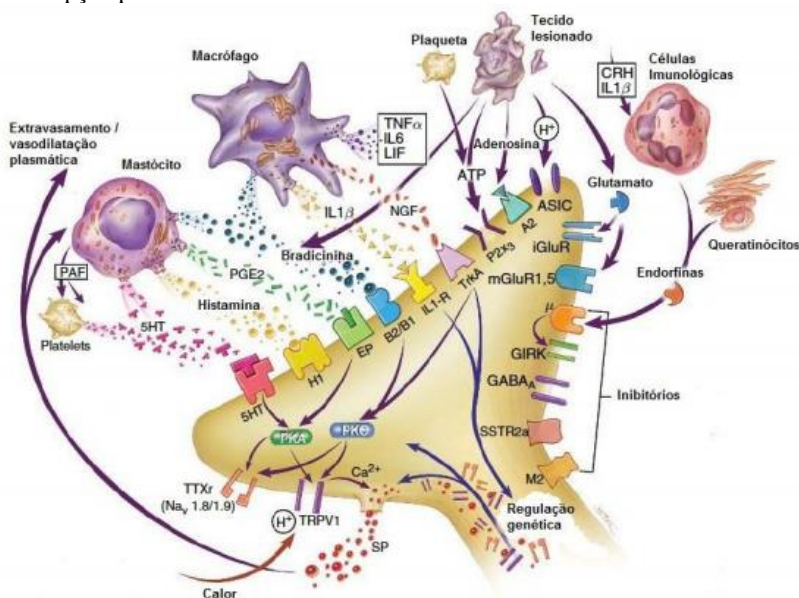
A sensibilização dos nociceptores é consequência comum de todos os tipos de dor inflamatória (CUNHA et al., 1999; GARRY; JONES; FLEETWOOD-WALKER, 2004; LAMONT; TRANQUILLI, 2000; SCHAIBLE, 2006; 2007). A hiperalgesia inflamatória é a consequência da sensibilização dos neurônios aferentes primários, em particular das fibras C polimodais de alto limiar. As mudanças no tecido inflamado e sistema nervoso são consequência da diminuição do limiar nociceptivo, induzido por mediadores inflamatórios, que têm a capacidade de sensibilizar diretamente o neurônio nociceptivo periférico (WOOLF et al., 1997; CUNHA et al., 2008). A estimulação dos nociceptores pode advir da mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico) (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Durante a inflamação, subpopulações de leucócitos podem desempenhar diferentes papéis na geração de hiperalgesia, embora sua real contribuição não esteja totalmente esclarecida. A ação recíproca entre subpopulações específicas de leucócitos, células residentes e mediadores pró-algésicos resultam em dor e inflamação. Os mediadores pró-algésicos como espécies reativas de oxigênio (EROs) podem estimular os receptores TRP, desempenhando um importante papel na patogênese das dores aguda e crônica. A atração de monócitos/macrófagos pela quimiocina CCL2, por exemplo, desencadeia diretamente EROs via NADPH oxidase, demonstrando uma relação direta com o desenvolvimento de hiperalgesia, evidenciando que EROs desempenham uma ligação molecular entre a quimiotaxia de monócitos e a dor inflamatória (HACKEL et al., 2013).

Assim, concomitantemente à ativação de células inflamatórias, ocorre a liberação local de mediadores químicos, tais como bradicinina, prótons, histamina, serotonina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico (NO), substância P (SP), neurotrofinas, bombesina, somatostatina, acetilcolina, entre outros. Esses mediadores interagem com nociceptores específicos conduzindo à propagação do sinal nociceptivo por alteração na permeabilidade da membrana da fibra nervosa, originando o potencial de ação (GRIFFIS; COMPTON; DOERING, 2006). O NO, por exemplo, pode ativar fibras sensoriais diretamente e também por alterar a disponibilidade de mediadores como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e SP (HANDY, 1999). Em vários modelos de dor, há aumento da expressão de isoformas de NO na medula espinal de roedores após injeção intraplantar de capsaicina (WU et al., 2001), formalina (LAM, 1996), carragenina (TAO, 2003) ou CFA (CHU et al., 2005).

Uma vez liberados, esses mediadores inflamatórios podem ativar ou sensibilizar nociceptores adjacentes ao tecido lesionado resultando na sensação dolorosa (ANDRADE et al., 2012). Portanto, quando os nociceptores são estimulados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos (pró-inflamatórios), esses apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (KONTINEN; MEERT, 2002), não atuando apenas como detectores de estímulos nocivos, mas podendo ser ativados também por estímulos inócuos e de baixo limiar (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009) (Fig. 1). Além disso, quando alterações patofisiológicas propagam a dor de forma independente do estímulo deflagrador, um estado de dor crônica pode se estabelecer (LEE, 2013).

Figura 1 - Influência de substâncias liberadas por células inflamatórias na nocicepção periférica



Legenda: A figura ilustra um terminal neuronal periférico sendo ativado por substâncias pró- e anti-inflamatórias liberadas por diversas células inflamatórias após uma lesão tecidual. *PAF: fator de ativação plaquetária; PGE₂: prostaglandina E₂; IL-1β: interleucina-1 beta; TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: interleucina-6; 5HT: serotonina; PK: proteína cinase; TRPV1: receptor vanilóide de potencial transiente do tipo 1; Nav 1.8/1.9 TTRr: canal de sódio voltagem dependente 1.8/1.9 tetratoxina resistente; SP: substância P; SSRT2a: receptor para somatostatina periférico do tipo 2a; M2: receptor muscarínico do tipo 2; GIRK: canal de potássio retificadores de influxo; mGlu 1.5: receptor glutamatérgico metabotrópicos do tipo 1.5; iGluR: receptor glutamatérgico ionotrópico; ASIC: canal iônico sensível a ácido; A2: P2X3: receptor purinérgico do tipo 2X3; TrKA: receptor tirosina cinase A; IL-1R: receptor para IL1; B2/B1: receptor para bradicinina; EP: receptor para prostaglandina; H1: receptor para histamina do tipo 1. Fonte: adaptado de Ringkamp e Meyer, 2009.

Os mediadores inflamatórios como a histamina, serotonina, glutamato e prostaglandinas induzem comportamento nociceptivo quando injetados periféricamente (CARSTENS, 1997; MILLAN, 2002). A aplicação de serotonina em tecidos periféricos produz dor em humanos (ERNBERG, 2000) e induz comportamento nociceptivo e hiperalgesia

em roedores (PARADA, 2001). Além disso, a serotonina participa da nocicepção induzida por formalina ou carragenina (DOAK; SAWYNOK, 1997) e induz excitação e sensibilização de fibras aferentes primárias (RUEFF; DRAY, 1992). Por outro lado, a histamina é um dos mediadores inflamatórios local conhecida por estar envolvida tanto no mecanismo periférico quanto central da dor. O envolvimento do receptor H2 de histamina no controle da dor foi bem descrito em testes de nocicepção mecânica e térmica em ratos (TAMANDDONFARD et al., 2008). Durante as respostas inflamatórias periféricas os mastócitos são a principal fonte de histamina e outros mediadores que sensibilizam os nociceptores e produzem resposta nociceptiva (REN; DUBNER, 2002).

Os mediadores inflamatórios também induzem a ativação ou a sensibilização de neurônios sensoriais, levando a alterações funcionais de neurônios do sistema nervoso central (SNC), que pode resultar em alodínia ou hiperalgesia. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”, enquanto a nocicepção é definida como “o processo neural de codificação e processamento do estímulo nocivo”. Essa definição fundamenta a dor como sendo uma percepção e não apenas uma modalidade puramente sensorial e considera a necessidade de processamento cognitivo para que a dor seja conscientemente experimentada (MORIARTY; McGUIRE; FINN, 2011).

No início do século XX, o conceituado fisiologista britânico Charles Scott Sherrington (1906) propôs um conceito-chave para nocicepção. Sherrington descreveu a existência de terminações nervosas livres na pele, responsáveis pela resposta nociceptiva reflexa (WOOLF; MA, 2007). De acordo com essa descrição, os nociceptores têm características particulares, como limites e sensibilidade que os distinguem de outras fibras sensoriais (JULIUS; BASBAUM, 2001). Em certos casos, estímulos que ativam nociceptores podem parecer mais agressivos do que realmente são, da mesma maneira que um estímulo inteiramente inócuo pode ser percebido como potencialmente doloroso, sendo esses fenômenos denominados de hiperalgesia e alodínia, respectivamente (LARSSON, 2009). Portanto, a hiperalgesia é a dor mais intensa induzida por um estímulo que originalmente é doloroso, enquanto a alodínia é a dor induzida por estímulos que, em condições normais, não provocam dor (LOESER; TREEDE, 2008).

A nocicepção compreende os mecanismos pelos quais os estímulos são detectados pelo sistema nervoso periférico (SNP), codificados, transmitidos e inconscientemente modulados pelo sistema nervoso. Em contrapartida, a dor é uma experiência consciente que demanda participação cortical e a informação aversiva da nocicepção. É uma experiência complexa e subjetiva, a qual possui um componente afetivo, acompanhado por elementos sensorial-discriminativo, autonômico e cognitivo (BARROT, 2012).

A detecção de estímulos nocivos requer ativação de nociceptores, os quais são amplamente distribuídos por todo o corpo e transmitem tanto a informação nociceptiva quanto a informação não nociceptiva para a medula espinal, dependendo do estímulo deflagrador. Os neurônios aferentes primários que respondem a estímulos de caráter nocivo são denominados nociceptores e são classificados em duas categorias gerais. São eles os nociceptores cutâneos A δ e A β , que possuem fibras pouco e altamente mielinizadas, respectivamente, e são responsáveis pela sensação de dor rápida e aguda, enquanto que os nociceptores C possuem fibras não-mielinizadas e produzem uma sensação de dor tardia (WILLIS, 2007). Estudos recentes demonstram o papel fundamental dos canais de sódio dependentes de voltagem do tipo Na v 1.8 no controle da excitabilidade de fibras A β , assim como sua potencial contribuição no desenvolvimento da alodínia mecânica após inflamação crônica persistente causada por CFA (BELKOUCH et al., 2014). Os corpos celulares dos nociceptores que inervam o tronco, os membros e as vísceras estão localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG), enquanto aqueles que inervam a cabeça, a cavidade oral e o pescoço estão localizados no gânglio trigeminal e conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinal e até o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (MACINTYRE et al., 2010). A parte superficial do corno dorsal da medula espinal (lâminas I e II) é a principal zona de terminação dessas fibras, as quais podem ser divididas em duas grandes classes neuroquímicas de acordo com seu conteúdo de peptídeos e a localização de seus terminais sinápticos no corno dorsal da medula espinal. São elas as fibras C peptidérgicas e as fibras C não-peptidérgicas, sendo que ambas respondem a estímulos nocivos semelhantes (HUNT; MANTYH, 2001).

A sinapse entre nociceptores e neurônios de segunda ordem no corno dorsal ocorre predominantemente dentro da lâmina II da medula espinal. Os neurônios de segunda ordem então cruzam a medula espinal para ascender no trato espinotalâmico com fibras terminais

predominantemente localizadas no tálamo. Uma vez que o sinal alcança o tálamo, neurônios de terceira ordem conduzem esses sinais por meio de axônios da cápsula interna para o córtex somatossensorial, onde aspectos discriminativo-sensoriais da dor são identificados. Além da localização somatossensorial, as fibras do núcleo inter-laminar e medial do tálamo irradiam para o giro cingulado anterior e tornam-se envolvidas nos componentes emocionais e afetivos da dor (RUSSO; BROSE, 1998).

Dentre os mediadores que têm sido propostos na gênese da dor, destaca-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que está envolvido na sinalização nociceptiva e hiperexcitabilidade neural (LEUNG; CAHILL, 2010; GEORGE et al., 1999; SCHÄFERS et al., 2003; SACERDOTE et al., 2008) e o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), constitutivamente expresso na pele, contribui para a homeostase tissular (ZHANG et al., 2014), que quando produzido no tecido em resposta à lesão tecidual, sensibiliza neurônios aferentes primários via receptor IGF-1R e produz hipersensibilidade dolorosa (MIURA et al., 2011). Alguns mediadores atuam por meio da interação com receptores acoplados à proteína G, desencadeando a formação de segundos mensageiros, como o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG), aumento de cálcio intracelular e ativação de canais iônicos. Outros mediadores da nocicepção podem ativar diretamente canais iônicos, os quais são capazes de alterar a permeabilidade da membrana celular a íons (DRAY; PERKINS, 1993; WOOLF; COSTIGAN, 1999; WOOLF; SALTER, 2000).

Mediadores como prostaglandinas e aminas simpáticas atuam, preferencialmente, em receptores metabotrópicos na membrana neuronal de fibras C, desencadeando a ativação de segundos mensageiros como AMPc, proteína cinase A (PKA) e proteína cinase C (PKC) (SWEITZER et al., 2004). Diversas evidências sugerem que a PKC fosforila componentes celulares envolvidos em modelos de dor inflamatória e persistente, incluindo enzimas, canais iônicos e receptores de membrana (CUNHA et al., 2004). Existem também, crescentes evidências de que a PKC medeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , assim como prostaglandinas, sugerindo que um papel relevante da PKC em induzir antinocicepção periférica envolve a inibição ou modulação de citocinas inflamatórias e prostaglandinas (JESSE et al., 2009; FERREIRA et al., 2005).

A dor é uma das modalidades sensoriais resultante da integração de vários níveis neurais, compreendendo, na maioria dos casos, a detecção

do estímulo na periferia e o processamento em áreas superiores do SNC (JULIUS; BASBAUM, 2001). A dor pode ser um indicador de dano tecidual, mas pode também ser experimentada na ausência de alguma causa identificável, como em algumas patologias (MACINTYRE et al., 2010).

2.1.1 Mecanismos endógenos de controle da dor

Além de exercer importante papel na interpretação da informação nociceptiva ascendente, as estruturas supraespinais também estão envolvidas na modulação dos circuitos descendentes que modulam a dor. As vias descendentes inibitórias são constituídas pelos sistemas corticais e diencefálicos, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e periventricular, que expressam grande quantidade de encefalinas e receptores opioides e estruturas adjacentes do bulbo ventromedial rostral (RVM), que exercem importante papel na integração e modulação das informações nociceptivas no corno dorsal da medula espinal (MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (MILLAN, 2002).

As fibras nervosas provenientes dessas vias liberam substâncias inibitórias, como por exemplo, opioides, serotonina, noradrenalina e ácido γ -aminobutírico (GABA) em sinapses com neurônios no corno da raiz dorsal da medula espinal. Essas substâncias ativam receptores específicos nos neurônios aferentes primários e inibem a transmissão nociceptiva. Supõe-se que a modulação endógena contribua para a grande diferença de percepção de dor observada entre os pacientes que possuem lesões semelhantes (ARGOFF, 2011).

Após a lesão tecidual, o sistema imunológico também libera fatores que auxiliam na supressão da inflamação, redução da dor e recuperação do tecido. Tem sido demonstrado que o recrutamento de células imunes contendo peptídeos opioides para o local da inflamação pode reduzir a dor inflamatória em certas condições (MOUSA et al., 2002). Em macrófagos, monócitos, granulócitos e linfócitos, o peptídeo opioide β -endorfina está presente em grânulos secretores organizados na periferia da célula, pronta para exocitose (MOUSA et al., 2004). Sabe-se que os leucócitos são uma importante fonte de opioides endógenos (β -

endorfina, encefalinas e dinorfina), mais especificamente, cerca de 16% dos leucócitos secretam opioides. Essas células expressam proopiomelanocortina, precursor da β -endorfina e possuem toda a maquinaria enzimática necessária para o processamento do peptídeo funcionalmente ativo (STEIN; MACHELSKA, 2011).

Após a lesão, os leucócitos e queratinócitos liberam opioides, principalmente β -endorfina (RITTNER; BRACK; STEIN, 2008; KHODOROVA et al., 2003). Estudos indicam que as endorfinas são expressas em células T, macrófagos e fibroblastos no tecido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide (HUA; CABOT, 2010). Por outro lado, a inflamação também induz a liberação de quimiocinas, como CXCL1 e CXCL2, que não só facilitam o recrutamento de leucócitos, mas também induzem a liberação de peptídeos opioides a partir dos leucócitos que migram para o sítio da lesão (HUA; CABOT, 2010). Ibrahim e colaboradores (2005) demonstraram que a ativação do receptor canabinoide do tipo 2 (CB2) em queratinócitos induz a liberação de β -endorfinas, que por sua vez pode reduzir a nocicepção periférica por atuar sobre os receptores μ -opioide de neurônios aferentes primários. Na periferia, a ativação dos receptores opioides hiperpolariza diretamente os neurônios sensoriais e atenua a sensibilização neuronal ou a hiperexcitabilidade induzida por inflamação ou lesão (HURLEY; HAMMOND, 2000).

2.2 TRATAMENTO DA DOR CRÔNICA

Atualmente, pesquisas estão sendo realizadas no intuito de esclarecer os mecanismos fisiológicos e emocionais da dor, visando a descoberta de novas terapias que possam reduzir ou até eliminar o processo doloroso (RASU et al., 2013). A dor associada a diferentes condições patológicas representa o sintoma que mais causa sofrimento aos pacientes, deste modo, diferentes abordagens terapêuticas têm sido utilizadas com o objetivo de minimizá-la (BRENNAN et al., 2007).

O tratamento deve basear-se na etiologia e fisiopatologia da dor e nas suas repercussões, envolvendo assim a eliminação do fator causal (RAMAMURTHY; ALANMANOU; ROGERS, 1993). As substâncias capazes de diminuir a condição inflamatória podem também ser empregadas no tratamento da dor. Atualmente, um número significativo de fármacos está disponível no mercado para o controle da dor, sendo que a maioria deles possui uma ação anti-inflamatória (JENSEN; MADSEN; FINNERUP, 2009). De fato, os anti-inflamatórios não-esteroidais

(AINEs) constituem o principal grupo de fármacos utilizados no tratamento da inflamação devido aos seus efeitos anti-inflamatório, antipirético e analgésico. Entretanto, questiona-se seu uso devido aos efeitos colaterais associados, que muitas vezes podem ser fatais, que incluem, principalmente, os efeitos gastrintestinais, alteração na função renal, alteração no tempo de coagulação, hipersensibilidade, dentre outros (MARNETT, 2009).

As intervenções farmacoterapêuticas mais comuns envolvem o uso de fármacos que promovem a remissão do processo inflamatório por meio da inibição da produção, da liberação ou da ação de mediadores endógenos pró-inflamatórios, ou mesmo pela produção de fatores endógenos com propriedades anti-inflamatórias. Os anti-inflamatórios não-esteroidais apresentam grande eficácia como agentes analgésicos e anti-inflamatórios (LIVINGSTON, 2000; PAPICH, 2000). Em contrapartida, os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), por oferecerem atividade anti-inflamatória mais eficaz do que aquela apresentada pelos AINEs, são empregados em pacientes com doenças inflamatórias crônicas, principalmente de origem autoimune (BARNES; ADCOCK, 1993).

Além dos AINEs, úteis para o alívio da dor, outra classe farmacológica muito usada é a dos analgésicos opioides (PAPICH, 2000). Apesar de que os opioides ainda são os fármacos mais eficazes para o tratamento da dor intensa, o seu emprego deve ser cauteloso devido aos efeitos colaterais, que incluem tonturas, depressão respiratória, náuseas, sedação, euforia ou disforia e prurido (KELLEY; TEPPER, 2012). Ademais, o uso prolongado de opioides leva ao desenvolvimento de tolerância e dependência (COSTANTINO et al., 2012).

No caso da dor neuropática, um tipo de dor crônica, a eficácia dos analgésicos de uso comum pode ser limitada e recomendam-se fármacos de outras classes terapêuticas. Diretrizes atuais estabelecem como fármacos de primeira-linha para a dor neuropática os antidepressivos tricíclicos, os estabilizadores de membrana, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina (IRSN), anestésicos tópicos e agentes duais, os quais têm como mecanismos de ação a inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina e a ação analgésica opióide-like (PARK; MOON, 2010).

Em contrapartida, medidas recentes para o tratamento da dor crônica visam reduzir a dor e o uso de medicamentos, reintegrar funcionalmente o doente e melhorar sua qualidade de vida, fazendo uso de medidas sintomáticas, especialmente no uso de medicamentos

adjuvantes (MOORE et al., 2013), fisioterapia (CUESTA-BARRIUSO, 2013) e intervenções psicológicas (KEEFE, 2013; ECCLESTON, 2013), ou seja, incluindo medidas não-farmacológicas como os recursos de medicina física e de reabilitação somados aos procedimentos psicoterápicos (CATALANO; HARDIN, 2004).

Várias terapias físicas são utilizadas no tratamento da dor crônica, podendo ser categorizadas em modalidades como terapia manual (RUBINSTEIN et al., 2011), exercício físico (NIJS et al., 2012), acupuntura (VAS et al., 2012), eletroterapia (KOCYIGIT et al., 2012), fototerapia (AMMAR, 2014), entre outras. Além disso, essas terapias vêm sendo amplamente estudadas para o tratamento das afecções dolorosas em modelos pré-clínicos (MARTINS et al., 2012; 2015; BOBINSKI et al., 2011; CIDRAL-FILHO et al., 2013; DA SILVA et al., 2011).

Não obstante aos esforços de pesquisadores em todo o mundo no entendimento dos mecanismos relacionados a indução e a manutenção da dor, bem como na descoberta de novas terapias mais efetivas, atualmente não se dispõe de tratamentos que possam efetivamente aliviar a dor crônica com a velocidade ou eficiência adequada aos pacientes, sem que, no entanto, causem efeitos colaterais significativos que comprometam sua utilização (BORSOOK, 2012).

2.3 INFLAMAÇÃO E CITOCINAS

A inflamação é uma resposta protetora que destina-se a eliminar agentes patogênicos e outros agentes agressores que têm potencial para causar dano celular, bem como células malignas e necróticas (MOILANEN, 2014). A inflamação (do Latim *inflammatio*, atear fogo) ou processo inflamatório é um termo geral para definir as mudanças que podem ocorrer nos tecidos vascularizados como resposta a danos teciduais, infecções ou reações imunológicas. O processo inflamatório consiste na resposta orgânica diante de uma lesão tecidual ou infecção e esse processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999). Portanto, a inflamação é reconhecida como um processo que acontece no tecido conjuntivo vascularizado, abrangendo os leitos capilares, o plasma, as células circulantes, os neurônios sensoriais e os constituintes celulares e extracelulares desse tecido (TRACEY, 2002; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999).

Durante o processo inflamatório, diversas substâncias são capazes de ocasionar modificações teciduais responsáveis pelos sinais cardinais clássicos da inflamação, que são: dor, calor, rubor, edema e perda de função. Ademais, os sinais cardinais são decorrentes da liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pelas alterações homeostáticas que ocorrem no tecido lesionado. Essas substâncias levam ao intumescimento tecidual, devido ao extravasamento de proteínas plasmáticas, saída de água para o tecido e transmigração de células inflamatórias, que têm como principal objetivo conter o agente agressor, podendo surgir de diversas situações, sejam elas por infecções persistentes, doenças inflamatórias autoimunes ou exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, exógenos ou endógenos (KUMAR; PERKINS, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Desse modo, em situações normais, o processo inflamatório é um mecanismo de proteção dos tecidos contra danos endógenos e exógenos. Muitos agentes e condições que podem levar a inflamação são conhecidos, como infecções virais e microbianas, doenças autoimunes, exposição a produtos químicos tóxicos ou alérgenos e também distúrbios metabólicos (KAULMANN; BOHN, 2014).

Dois estágios podem ser distinguidos durante o processo inflamatório, a fase aguda e a fase crônica. A inflamação aguda é o estágio inicial, que persiste por um curto período e normalmente é benéfica para o hospedeiro, pois auxilia no reestabelecimento da homeostase. Porém, se persistir por um período prolongado, pode evoluir para uma fase crônica, que é prejudicial ao organismo, pois pode resultar em uma resposta fisiológica anormal, aumentando o risco de dano celular e desenvolvimento de doenças crônicas, como o câncer (KAULMANN; BOHN, 2014). Em algumas situações e doenças, essa resposta pode se tornar excessiva, sem qualquer benefício, levando a sérios efeitos adversos (LEE, 2013; ALVES et al., 2013). Ou seja, uma resposta inflamatória excessiva ou prolongada pode levar a destruição tecidual e consequente perda de função (VERRI et al., 2012).

O processo inflamatório é complexo e depende de uma variedade de mediadores endógenos que ativam diferentes vias de sinalização (NORBERG et al., 2013). A interação entre células do sistema inato, sistema imune adaptativo e mediadores inflamatórios orquestram aspectos da inflamação aguda e crônica, que são a base de diversas doenças, contribuindo para o dano tecidual, estresse oxidativo, remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e fibrose em diversos tecidos (LIBBY, 2007). As células mononucleares (linfócitos, monócitos

e macrófagos) são as principais células presentes no infiltrado inflamatório na fase crônica (RITTNER et al., 2001).

Durante o desenvolvimento do processo inflamatório, pode-se citar o envolvimento de diversos mediadores químicos, podendo ser de origem tissular, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), citocinas, eicosanóides, radicais livres, NO e neuropeptídeos; ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, do complemento e das cininas (LAZO; PARKER; BRUNTON, 2006). Alguns desses mediadores produzidos por células inflamatórias, como citocinas, quimiocinas e metabólitos do ácido araquidônico, são importantes ativadores de cascatas de transdução de sinal, incluindo PKA, PKC, proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK), NO e proteína cinase ativada por mitógeno (MAPKs) (JI; STRICHARSTZ, 2004), além de fatores de transcrição, como NF- κ B e Nrf2 (KAULMANN; BOHN, 2014). No sítio inflamatório, esses mediadores têm efeitos distintos, como os vasculares, promovendo a vasodilatação, a estase vascular e o aumento da permeabilidade capilar; induzem também a migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e coordenam ainda as diversas respostas de defesa local (ROTH et al., 2006; KHAN et al., 2013).

Após a lesão tecidual ou infecção, o TNF- α e a interleucina 1 β (IL-1 β) são as primeiras citocinas sintetizadas, as quais agem sobre receptores específicos dos neurônios sensoriais e induzem a síntese de outros mediadores, como outras citocinas, quimiocinas, neurotrofinas, prostanoídes, NO, cininas, lipídios, ATP e membros da via do complemento. Esses mediadores, por sua vez, ocasionam proliferação e hipertrofia de células gliais no SNC, liberação de citocinas pró-inflamatórias importantes, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, compondo uma rede complexa de ativação interdependente (ZHANG; NA, 2007; OBATA; EISENACH; HUSSAIN, 2006; MILLER et al., 2009).

As citocinas são mediadores imprescindíveis para conduzir a resposta inflamatória aos locais de lesão e infecção, entretanto, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode despontar sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Determinadas citocinas podem ter ações pró ou anti-inflamatórias, dependendo do microambiente no qual estão situadas. Assim, as citocinas consideradas pró-inflamatórias, incluem as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF, e entre as citocinas consideradas anti-inflamatórias estão IL-4, IL-10, IL-13 e fator de crescimento transformante beta (FTC β) (CURFS, 1997; SOMMER;

WHITE, 2010). Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para lesões em órgãos-alvo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e à morte, diferentemente das citocinas anti-inflamatórias, que podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis (SOMMER; WHITE, 2010).

As citocinas são moduladores chave da inflamação, secretadas por diferentes células em resposta a uma variedade de estímulos, induzem efeitos característicos sobre o crescimento, a motilidade, a diferenciação e a função das células alvo. Por outro lado, essas substâncias também atuam em outros diferentes processos, como cicatrização, hematopoese e angiogênese. Uma determinada citocina pode ser secretada individualmente ou como parte de uma resposta coordenada, juntamente com outras citocinas não relacionadas. Ademais, uma citocina única pode levar a expressão de outras citocinas ou mediadores, induzindo assim, uma cascata de efeitos biológicos que amplificam a resposta inflamatória e influenciam seu desenvolvimento (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SOMMER; WHITE, 2010). Portanto, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a síntese e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar ou atenuar a resposta inflamatória. Dentre essas podemos citar as interleucinas (ILs), quimiocinas, interferons (IFNs) e o TGF β (SOMMER; WHITE, 2010).

Dentre as citocinas, destaca-se o fator de necrose tumoral (TNF), que desempenha um papel fundamental nas inflamações aguda e crônica e no desenvolvimento de doenças autoimunes e câncer. Diversos TNFs participam de processos inflamatórios, entre eles destacam-se o TNF- α e o TNF- β , sintetizados especialmente por macrófagos e linfócitos T, respectivamente (TANSEY; SZYMKOWSKI, 2009). A interação do TNF com seu respectivo receptor, TNFR1 ou TNFR2, pode resultar na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína ativadora-1 (AP-1), responsáveis pela transcrição de genes para diversas citocinas inflamatórias, além de estimularem a síntese de diversos mediadores inflamatórios. O TNF pode induzir apoptose, formação de espécies reativas de oxigênio e necrose celular (CHU, 2013) e o TNF- α , por exemplo, pode mediar a hiperalgesia mecânica e térmica após injeção intraplantar de CFA (WOOLF et al., 1997).

Dentre os diversos agentes envolvidos no processo inflamatório periférico, destacam-se a histamina e a serotonina, importantes mediadores inflamatórios que apresentam potente ação vasodilatadora e de aumento da permeabilidade vascular (LINARDI et al., 2000). Os

mastócitos são as principais células que sintetizam e liberam histamina e serotonina, podendo a sua liberação ser induzida pela estimulação com o composto 48/80 (poliamina extraída do veneno de abelhas), que após consecutivas administrações leva a depleção desses mediadores (DI ROSA et al., 1971). Desse modo, o composto 48/80 causa uma massiva degranulação de mastócitos, que promove a liberação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, leucotrienos e uma variedade de citocinas que podem provocar muitos eventos associados à inflamação (DATTI et al., 2012). Estudos mostram que a degranulação de mastócitos induzida pelo tratamento repetido com o composto 48/80 reduz a concentração de mediadores inflamatórios no tecido inflamado (DI ROSA et al., 1971), assim como previne a nocicepção pós-operatória e reduz a concentração de histamina e serotonina e a atividade da triptase no tecido da pata de camundongos. Portanto, esses são fatores que indicam que a ativação de mastócitos é importante, por exemplo, para o desenvolvimento da dor pós-operatória (OLIVEIRA et al., 2011).

Na década de 50 e 60, Carl Pearson divulgou vários trabalhos descrevendo a metodologia da artrite induzida por CFA. A administração intraplantar de CFA em ratos causa poliartrite migratória, e essa reação se assemelha muito com a artrite reumatoide humana. A reação inflamatória que ocorre nesse modelo não é infecciosa, mas sim, uma resposta imuno-mediada contra algum constituinte da bactéria injetada (bacilo da tuberculose) (PEARSON, 1956; PEARSON; WAKSMAN; SHARP, 1961). A indução da artrite induzida por CFA pode resultar em monoartrite ou poliartrite. A poliartrite é desenvolvida quando o adjuvante é administrado na superfície intraplantar, subcutânea, intradérmica ou na base da cauda (NEUGEBAUER et al., 2007).

Apesar de o CFA desencadear uma resposta inflamatória acentuada dentro de poucas horas após sua injeção intraplantar, ele também é utilizado para avaliar a dor persistente, pois age tanto na sensibilização dos neurônios periféricos (pois possui uma ação direta, sem a participação de prostanóides), quanto por meio da sensibilização central de neurônios da medula espinal (WOOLF; MA, 2007). A administração de CFA na pata de ratos induz uma inflamação periférica e aumento da concentração de TNF- α , IL-1 β e fator de crescimento do nervo (NGF) 3 horas após a sua aplicação (WOOLF; MA, 2007).

A resposta de citocinas na inflamação é extremamente complexa, pois envolve aumento da expressão de fatores pró e anti-inflamatórios, que agem e integram com um vasto número de células produzindo muitas mudanças, dependentes ou não de fatores de transcrição (WOOLF; MA,

2007). Esse modelo é amplamente empregado na pesquisa de terapias úteis no controle da dor e inflamação, estabelecendo um modelo de grande similaridade com doenças crônicas humanas, visto que a injeção intraplantar de CFA produz hiperalgesia intensa e persistente em roedores (WOOLF; COSTIGAN, 1999).

2.3.1 Inflamação e estresse oxidativo

Durante a inflamação crônica, células do sistema imune, como macrófagos e leucócitos são recrutadas para o sítio da lesão, resultando no aumento da concentração de enzimas lisossômicas e na superprodução de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), fatores de crescimento e outros mediadores da inflamação (KUMAR; PERKINS, 2010). Esse processo gera estresse oxidativo e dano à importantes biomoléculas, tais como proteínas, lipídios, lipoproteínas e DNA, de modo que esse cenário favorece a expansão e/ou perpetuação da resposta inflamatória (GURPREET et al., 2006).

Neste sentido, a geração de espécies reativas de oxigênio é um fator imprescindível na manutenção da resposta inflamatória e na ativação de células inflamatórias. Essas alterações podem, por sua vez, gerar EROs, acarretando em um ciclo vicioso de produção excessiva de EROs, levando à estresse oxidativo e aumento do quadro inflamatório (TAHA; BLAISE, 2012). Além disso, esse quadro vem sendo implicado em um grande número de processos patológicos, incluindo lesão celular, câncer, envelhecimento e algumas doenças degenerativas (KUMAR; PERKINS, et al., 2010).

As EROs são constantemente formadas nos sistemas biológicos e, desta maneira, os organismos desenvolveram defesas antioxidantes de forma a proteger-se de possíveis danos celulares (DE MARCHI et al., 2013). De fato, um antioxidante protege biomoléculas ou estruturas celulares dos efeitos deletérios de substâncias que promovem oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Assim, a diminuição das defesas antioxidantes e/ou o aumento da produção das espécies reativas, resultam no estresse oxidativo (JURÁNEK et al., 2013).

Os antioxidantes endógenos e exógenos atuam sinergicamente, onde o sistema antioxidante endógeno é constituído por enzimas, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (HALLIWELL, 1996). A SOD catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, a chamada reação de dismutação, já a CAT catalisa a reação onde o peróxido de hidrogênio é detoxificado em água e oxigênio.

Portanto, essas são importantes enzimas antioxidantes para quase todas as células expostas a EROs, juntamente com outras enzimas que também fazem parte desse sistema, como a glutathione peroxidase (KEEBLE et al., 2009).

Estudos prévios têm evidenciado que EROs exercem um importante papel no desenvolvimento da dor, principalmente na geração de dor neuropática e possuem significativa contribuição na sensibilização central (FIDANBOYLU; GRIFFITHS; FLATTERS et al., 2011; IBI et al., 2008). A geração periférica de EROs, como peróxido de hidrogênio, por exemplo, parece estar envolvida na patofisiologia da dor via receptor de potencial transiente ankyrin 1 (TRPA1) (TREVISANI et al., 2007) e receptor vaniloide de potencial transitório 1 (TRPV1) (KEEBLE et al., 2009). Muitas patologias geradas em condições inflamatórias ou de estresse oxidativo são também ativadoras de TRPA1 (SCHWARTZ et al., 2009).

2.4 FOTOTERAPIA

O emprego terapêutico da luz para o tratamento de diversas condições de saúde, conhecido como “fototerapia”, é uma das modalidades terapêuticas conhecidas mais antigas. De fato, os benefícios da luz solar no tratamento de afecções cutâneas tem sido explorados há mais de mil anos no antigo Egito, Índia e China (BAROLET, 2008). É digno de nota que a terapia solar foi redescoberta pelo dermatologista e pesquisador dinamarquês Niels Riberg Finsen, que recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1903, em reconhecimento a sua contribuição para o tratamento da *lúpus vulgaris* com doses concentradas de radiação ultravioleta (UV), uma forma de terapia fotônica (ROELANDTS, 2002).

Até o início da década de 80, os mecanismos da radiação eletromagnética em nível molecular e celular eram desconhecidos. Trabalhos científicos realizados ao longo desse período estabeleceram as bases para a compreensão dos mecanismos moleculares associados aos efeitos da luz sobre as células (KARU, 1987). Descobriu-se que a resposta celular à fotoestimulação não está associada a propriedades específicas da luz, como a coerência, ampliando o uso de fontes emissoras de luz não coerentes como os diodos emissores de luz (LEDs), já que são dispositivos mais baratos, de maior facilidade de manuseio e operam com correntes elétricas relativamente baixas em comparação aos LASERS (SCHUBERT, 2006).

Os exatos mecanismos de ação da fototerapia ainda não estão completamente elucidados (BAROLET, 2008), porém, atualmente algumas hipóteses são discutidas. A fotobiomodulação ocorre por meio da aplicação da luz monocromática no tecido, a qual influencia a atividade celular por estimular ou inibir funções bioquímicas e fisiológicas. A magnitude do efeito da fotobiomodulação é influenciada pelo comprimento de onda, densidade de energia (ou fluência), tipo de lesão e o espectro de absorção da molécula fotoceptora, que são moléculas capazes de serem excitadas pelos fótons incidentes (HUNG et al., 2009).

Ao ser irradiado sobre a pele, o feixe luminoso sofre dois processos: uma parcela é refletida e outra parte penetra no tecido em proporções que dependem do comprimento de onda, das características do tecido receptor e do ângulo de incidência (LOW, 2001; BAXTER, 2003). A parcela da radiação luminosa que não é refletida pode sofrer absorção ou espalhamento, consistindo esse último, em qualquer mudança na direção da propagação do feixe luminoso (TIPLER, 2000). Finalmente, a radiação luminosa é absorvida por moléculas fotoceptoras e, dentre essas estão os aminoácidos, os ácidos nucleicos e os cromóforos. Os aminoácidos e ácidos nucleicos apresentam absorção mais significativa no espectro ultravioleta (BAXTER, 1995), os cromóforos, por sua vez, absorvem luz no espectro visível, sendo a hemoglobina e a melanina os mais comuns (BAXTER, 2003; NUSSBAUM; BAXTER; LILGE, 2003), além de alguns componentes da cadeia respiratória, sobretudo a citocromo c-oxidase, que absorve tanto a radiação no espectro visível quanto no infravermelho (KARU, 1999).

Algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação da fototerapia são cogitadas, mas a mais aceita é a que a interação entre a molécula fotoceptora e o feixe luminoso acelera a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial por meio de uma mudança nas propriedades de oxirredução dos transportadores (KARU, 2002). Além da mitocôndria, outras moléculas fotoceptoras, como as porfirinas e flavoproteínas, também podem ser convertidas em estruturas fotossensibilizadas, com a geração de oxigênio molecular (O_2), podendo desempenhar papel mediador nos efeitos biológicos da irradiação (KARU, 1999).

Esses mecanismos que acontecem durante a exposição à luz são acompanhados por reações escuras, que são mecanismos secundários que ocorrem quando a radiação é desligada. Desse modo, uma complexa cascata de sinalização celular ou transdução e amplificação do sinal fotônico se inicia, associada, por exemplo, a mudanças na homeostase

celular, alterações nos níveis de ATP ou AMPc, modulação da síntese de DNA e RNA, alterações da permeabilidade da membrana, alcalinização do citoplasma e despolarização da membrana da célula (GRECO et al., 1989; VACCA et al., 1993; 1994; KOLAROVA; DITRICOVA; WAGNER, 1999; REDDY, 2004). Essa sequência de eventos, por fim, resulta em uma série de efeitos fisiológicos essenciais ao processo de cicatrização tecidual, analgesia, aceleração de processos inflamatórios, reabsorção de edemas e regeneração de vasos linfáticos (GRECO et al., 1989; VACCA et al., 1993; 1994; BAXTER, 1995).

Evidências sugerem que a fotobiomodulação envolve a estimulação do metabolismo celular e produção de energia mediada pelas mitocôndrias como fotorreceptor primário, sendo essa, alvo para a absorção de fótons. Portanto, na mitocôndria, o complexo IV da cadeia respiratória (citocromo c-oxidase), constitui-se o principal cromóforo que absorve a luz incidente, apesar de que outras moléculas também possam estar envolvidas nesse mecanismo. Desta forma, a absorção de luz leva ao aumento da atividade da citocromo c-oxidase (HU et al., 2007; KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005), aumentando a síntese de ATP (PASSARELLA et al., 1984; PASTORE et al., 1996). Assim, as alterações em moléculas sinalizadoras intracelulares, tais como íons cálcio, EROs e fatores de transcrição redox sensíveis, como o NF- κ B, também estão envolvidos nos efeitos da luz (SHARMA et al., 2011).

Acredita-se também que a ação da luz sobre o tecido está relacionada à possibilidade de inibir fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação, de interferir com os efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação (LIN et al., 2007; CAMPANA et al., 1998), inibir a síntese de prostaglandinas, além de inibir o esfíncter pré-capilar por meio de mediadores químicos (SATTAYUT et al., 2000).

Em fototerapia, um fator essencial para aquisição do efeito terapêutico é a escolha correta dos parâmetros de irradiação, que envolvem a seleção do comprimento de onda e dosimetria apropriadas (ENWEMEKA, 2009). De acordo com a lei de Arndt-Schultz, que prevê base teórica para a determinação da dosimetria, em densidades de irradiação mais baixas ocorre a bioestimulação, e de maneira inversa, em densidades de irradiação mais altas, ocorre a bioinibição (BAXTER, 2003; TÚNER, 2004). Assim, doses muito pequenas não seriam suficientes para promover efeitos biológicos importantes, e o aumento da densidade de energia para além de um determinado limiar poderia danificar os fotoceptores, com consequente redução do metabolismo (KARU, 1987). Igualmente, em conformidade com essa lei, ainda que de

forma geral, estudos indicam que a bioestimulação ocorre em densidades de energia entre 0,5 e 10 J/cm² (O'KANE et al., 1994; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997; SCHINDL et al., 2003). Porém, é importante salientar que tais estudos foram realizados a partir de resultados obtidos com LASER de baixa intensidade, contudo, sugere-se que tais mecanismos são comuns para os diferentes tipos de fototerapia de baixa intensidade, como a LEDT (VINCK et al., 2003; 2005; 2006; BAROLET, 2008).

2.4.1 Terapia por diodo emissor de luz

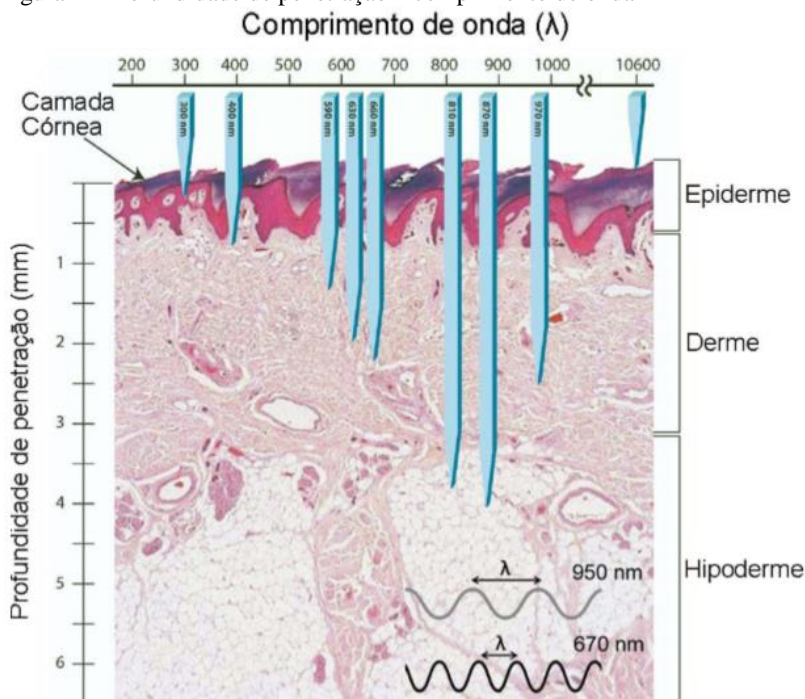
Durante as últimas décadas, a LEDT, uma forma de fototerapia não-invasiva e de baixo custo, vem sendo empregada clinicamente (CASALECHI et al., 2009). A LEDT é uma forma de fototerapia que utiliza como fonte de irradiação os LEDs (VINCK et al., 2005). Os LEDs são diodos semicondutores complexos (junção P-N) que quando energizados emitem luz (SCHUBERT, 2006). Além disto, os LEDs convertem corrente elétrica em um espectro luminoso estreito não-coerente e não fornecem energia suficiente para causar danos teciduais, sendo aprovado pela FDA norte-americana (*Food and Drug Administration*) para uso em humanos. Os LEDs emitem luz quase monocromática, não colimada e não coerente, em uma banda espectral muito estreita, entre 5 e 30 nm de largura e, quando o comprimento de onda e a dose são corretamente selecionados, os picos de emissão se ajustam precisamente aos picos de absorção dos cromóforos endógenos (COSTA; CORRAL-BAQUES; AMAT, 2007).

O uso da LEDT foi inicialmente impulsionado por pesquisas realizadas pela NASA (*National Aeronautics and Space Administration*), a qual constatou que a luz emitida de LEDs em comprimentos de onda específicos, acelerou o crescimento de plantas em estações espaciais, assim como a cicatrização de tecidos e reduziu a dor (BAROLET, 2008). Na década de 60, Endre Mester, um médico húngaro, deu início a uma série de experimentos sobre o possível potencial carcinogênico do LASER de baixa potência em camundongos. Para sua surpresa, o LASER não causou câncer, mas aumentou o crescimento de pelos dos animais (MESTER; SZENDE; GARTNER, 1968). Essa foi a primeira demonstração de fotobioestimulação com a terapia de LASER de baixa intensidade, estimulando-o a desenvolver outros estudos que fornecessem suporte para a eficácia da aplicação de luz vermelha na cicatrização de

feridas. Desde então, tratamentos utilizando fontes de luz coerente (LASER) e não coerente (LEDs) têm sido ampliados (BAROLET, 2008).

A LEDT com comprimento de onda no espectro do vermelho ao infravermelho, na faixa espectral de 600-1200 nm, que é considerada uma “janela terapêutica” (NIEMZ, 2007; BAROLET, 2008) (Fig. 2), pode estimular a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno, promover angiogênese, estimular macrófagos e linfócitos por melhorar o metabolismo energético mitocondrial, além de promover a produção de fatores de crescimento (EELLS et al., 2004; DESMET et al., 2006). Ademais, sugere-se que a LEDT nesta faixa espectral (600-1200 nm) altera a expressão de genes envolvidos na cicatrização de tecidos e reduz a transmissão dolorosa (EELLS et al., 2004). A LEDT com comprimento de onda de 625 a 940 nm, também produz efeitos positivos em importantes atividades biológicas, como a síntese de ATP, redução de edema e migração de células inflamatórias, diminuição da produção de citocinas e mediadores inflamatórios (SERAFIM et al., 2011; CORAZZA et al., 2007).

Figura 2 - Profundidade de penetração x comprimento de onda



Legenda: Estudos indicam que a radiação vermelha e infravermelha penetra os tecidos biológicos com menor perda, atingindo estruturas mais profundas, fato que delimita uma importante “janela terapêutica”, entre cerca de 600 nm e 1200 nm. Fonte: Adaptado de Barolet (2008).

Estudos demonstram que a incidência da luz de LEDs na cor vermelha (625 a 740 nm) sobre o tecido, estimula a liberação de substâncias vasodilatadoras, como a histamina e o NO, facilitando a drenagem da área inflamada, bem como a ativação da enzima superóxido dismutase, que controla a ação dos superóxidos, estabiliza o pH, diminui a adesão plaquetária e estimula a microcirculação. Portanto, a irradiação da luz estimula uma melhor permeabilidade da membrana celular e aumenta a função mitocondrial, favorecendo a melhora do metabolismo celular, proporcionando ao tecido lesionado condições de autorregeneração, acelerando etapas da inflamação e minimizando o uso de medicamentos (ERDLE et al., 2008; LIN et al., 2007; TRELLES; ALLONES, 2006). Do mesmo modo, uma *downregulation* da enzima ciclooxigenase (COX) e a inibição da síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2)

também ilustram o potencial anti-inflamatório da LEDT (DE MORAIS, 2010). Além disto, foi demonstrado que a irradiação com LEDT 635 nm inibiu a expressão de COX e PGE₂, assim como diminuiu a concentração de EROs e a expressão de mRNA da fosfolipase A₂ (PLA₂), resultando em uma função anti-inflamatória (WONG-RILEY, 2006).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a aplicação da LEDT (950 nm, 80 mW/cm², 9 J/cm²) reduz a dor pós-operatória, a qual é induzida pela incisão plantar (IP) em camundongos, e que esta analgesia é dependente da liberação de opioides endógenos. Além disto, mostrou-se que os leucócitos locais são as possíveis fontes dos opioides responsáveis por este efeito. Adicionalmente, foi demonstrado o envolvimento dos sistemas adenosinérgico (receptores A₁) e canabinoide (receptores CB₁ e CB₂) tanto ao nível medular como periférico; bem como da via L-arginina/NO/cGMP no efeito anti-hiperalgésico da LEDT (CIDRAL-FILHO et al., 2014).

Outro estudo do grupo, mostrou que a LEDT (950 nm, 80 mW/cm², 2,5 J/cm²) é eficaz contra a dor neuropática, tendo reduzido significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo esmagamento do nervo isquiático (ENI) em camundongos, sendo que o efeito analgésico do LEDT foi dependente da dose e não induziu tolerância. Por outro lado, o tratamento crônico com a dose analgésica de 2,5 J/cm² de LEDT não acelerou a recuperação da função motora, nem estimulou a regeneração nervosa após lesão por ENI (CIDRAL-FILHO et al., 2013).

Outros estudos demonstram a eficácia da LEDT em diversas condições de saúde, como osteoartrite de joelho (COELHO et al., 2014), *herpes zoster* oftálmica (PARK et al, 2013), afecções dermatológicas (BAROLET, 2008), entre outros.

Para que haja um incremento na utilização da terapia, essa deve ser fundamentada em estudos que comprovem sua eficácia e segurança. Desta forma, justifica-se a importância de investigações científicas adequadas sobre os possíveis efeitos fotobiológicos específicos que assegurem ou não a utilização dessa terapêutica no manejo da dor inflamatória crônica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da LEDT (830 ou 950 nm) em um modelo animal de hiperalgesia inflamatória crônica, bem como investigar alguns dos possíveis mecanismos fotobiológicos envolvidos nesse efeito.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar o efeito da LEDT (830 ou 950 nm) na hiperalgesia mecânica e térmica em animais com inflamação crônica da pata;
- b) Avaliar o efeito da LEDT (830 ou 950 nm) no edema de pata em animais com inflamação crônica;
- c) Verificar o envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico da LEDT (830 ou 950 nm);
- d) Analisar a influência da participação de leucócitos e mastócitos no efeito anti-hiperalgésico da LEDT (830 ou 950 nm);
- e) Verificar o efeito da LEDT na hiperalgesia mecânica induzida pela histamina ou IGF-1 (830 ou 950 nm);
- f) Avaliar o efeito da LEDT (830 ou 950 nm) na concentração de citocinas pró-inflamatórias e de fator de crescimento;
- g) Analisar o efeito da LEDT (830 ou 950 nm) no estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (número total de 160 animais, de aproximadamente 2 meses de idade, com 25 a 35 gramas) obtidos do Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas a partir das 6 horas) e com ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurociência Experimental (LaNEx) da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL. Os animais foram mantidos na sala de experimentos para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos testes comportamentais, os quais foram realizados das 8:00 às 14:00 horas. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos da LEDT. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA –UNISUL protocolo 13.007.4.08.IV e CEUA – UFSC protocolo PP00745).

4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA

Para avaliar o possível efeito anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e antioxidante da LEDT, foi utilizado o modelo de inflamação crônica induzida pela administração de 20 μl via intraplantar (i.pl.) de solução do adjuvante completo de Freund (CFA, 80%, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO).

4.3 APLICAÇÃO DA LEDT E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O dispositivo de LED utilizado nos experimentos foi um MOLIMEDpen® (MDT Bioelectronics, Bettwiesen, Suíça), com os comprimentos de onda de 950 nm com 80 mW/cm² de irradiância ou 830 nm com 20 mW/cm² de irradiância, consistindo em uma área de aplicação de 1 cm² em ambas as aplicações. A aplicação foi realizada com os animais acordados, mantidos em tubo de plástico com os membros inferiores expostos durante a aplicação. A irradiação foi aplicada

diretamente sobre a superfície plantar da pata posterior direita, local que recebeu a injeção de CFA, com o dispositivo em leve contato com a pele do animal. Em ambos os experimentos, agudo e crônico, os animais receberam apenas um tratamento diário com o dispositivo de LEDT.

No primeiro experimento, no qual direcionou os experimentos subsequentes utilizou-se diferentes grupos de animais que receberam aplicação de LEDT de dois comprimentos de onda (830 ou 950 nm) com diferentes fluências (1, 2 ou 4 J/cm²), sendo o grupo controle tratado com o dispositivo desligado. Após a aplicação da LEDT o comportamento nociceptivo (hiperalgesia mecânica e térmica) e edema, bem como as quantificações de citocinas e de estresse oxidativo foram realizados conforme descrito a seguir.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamento de von Frey como previamente descrito por Martins e colaboradores (2013). Os valores percentuais referentes à frequência de retirada da pata, frente a 10 estimulações da pata posterior direita com o monofilamento de von Frey (0,4 g) (Stoelting Co., Wood Dale, Illinois, EUA), foram considerados como indicativo de hiperalgesia mecânica. No dia anterior à administração do CFA, os animais foram submetidos ao teste de von Frey para caracterização da resposta basal, a partir dessa avaliação foram selecionados apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta de no máximo 20%. O teste foi realizado utilizando uma plataforma de 70 x 40 cm, que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior direita, os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberto com tampa, posicionada sobre a plataforma. O filamento foi aplicado atendendo à alguns critérios como: (1) a aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar; (2) a pressão foi suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; (3) os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; e (4) a resposta de retirada da pata foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio. No experimento agudo (1º dia), essa avaliação foi realizada antes (basal) e 24 h após da injeção de CFA, e também em 0,5, 1 e 2 horas após a aplicação da LEDT (830 ou

950 nm). No experimento crônico, essa avaliação foi realizada antes e após a injeção de CFA, e em 1, 2, 3, 4 e 5 dias, 30 minutos após a aplicação da LEDT (830 ou 950 nm). E por fim, no 5º dia os animais foram avaliados 0,5, 1 e 2 horas após a aplicação da LEDT (830 ou 950 nm).

4.4.2 Avaliação da hiperalgesia térmica

Para avaliação da hiperalgesia térmica foi utilizado o teste da placa quente (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Os camundongos foram colocados dentro de um cilindro de acrílico (40 cm de altura por 20 cm de diâmetro), sobre a superfície de uma placa de metal, previamente aquecida (48 ± 2 °C), trinta minutos após a aplicação da LEDT (830 ou 950 nm). O tempo (latência) em segundos que o animal levou para levantar a pata traseira direita (inflamada) sobre a placa previamente aquecida foi cronometrado e considerado como indicativo de hiperalgesia térmica. Para evitar danos teciduais, o tempo máximo permitido de permanência dos animais na placa previamente quente foi de 40 segundos (CAVANAUGH et al., 2009). Os animais foram avaliados no 1º e 5º dia após a injeção de CFA, 30 minutos após a aplicação da LEDT (830 ou 950 nm).

4.4.3 Avaliação do edema

Para avaliar o efeito da LEDT sobre o edema de pata, o volume da pata posterior direita foi mensurado por meio de um pletismômetro de pata (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos como variação do volume de pata em relação ao volume basal. Essa avaliação foi realizada no 0, 1º, 2º, 3º, 4º e 5º dia após a injeção de CFA. As leituras pletismométricas foram realizadas 30 minutos após a aplicação da LEDT (830 ou 950 nm).

4.5 ANÁLISE DO MECANISMO FOTOBIOLÓGICO DO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA LEDT

4.5.1 Avaliação do envolvimento dos receptores opioides

Para avaliar o envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico da LEDT (830 ou 950 nm), diferentes grupos de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA foram pré-tratados com uma injeção i.pl. de naloxona (5 µg/pata, Sigma Chemical Co. St. Louis,

MO) ou solução salina (20 µl/pata) na pata traseira direita, 15 minutos antes do tratamento com a LEDT (830 nm ou 950 nm, 2 J/cm²), sendo o grupo controle tratado com o dispositivo desligado. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 minutos após a aplicação da LEDT (830 ou 950 nm). A dose de naloxona utilizada foi escolhida com base na literatura especializada (MARTINS et al., 2012).

4.5.2 Avaliação da participação de leucócitos

Nesta etapa foi investigado se o efeito anti-hiperalgésico da LEDT (830 ou 950 nm) depende da participação dos leucócitos como fonte de opioides na pata. Para isto, os camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA foram pré-tratados com solução salina (10 ml/kg, i.p.) ou fucoidina (uma droga que se liga fortemente às selectinas impedindo o rolamento de leucócitos, 100 µg/kg, i.p., Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) (CUNHA et al., 2008) 20 minutos antes do tratamento com a LEDT (830 nm ou 950 nm, 2 J/cm²) (CIDRAL-FILHO et al., 2014), sendo o grupo controle tratado com o dispositivo desligado. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 minutos após o tratamento com a LEDT (830 ou 950 nm).

4.5.3 Avaliação da participação de mastócitos

Nesta etapa foi verificado se a LEDT (830 ou 950 nm) poderia atuar inibindo a liberação de histamina de mastócitos. Para este fim, 4 dias antes da injeção i.pl. de CFA, os animais receberam injeções i.pl. diárias na pata direita do composto 48/80 (uma droga que causa depleção dos mediadores dos mastócitos produzida pelo pré-tratamento repetido, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) em diferentes doses: 1, 3, 10 e 10 µg/pata, do 1º ao 4º dia, respectivamente, conforme descrito por Piovezan e colaboradores (2004). Ou seja, no 1º dia os animais receberam uma dose de 1 µg/pata, no 2º dia, 3 µg/pata, e no 3º e 4º dias, 10 µg/pata. Vinte e quatro horas após a última injeção os animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA. Por fim, 24 horas após o CFA os animais receberam a aplicação da LEDT (830 nm ou 950 nm, 2 J/cm²), sendo o grupo controle tratado com o dispositivo desligado. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 minutos após aplicação da LEDT (830 ou 950 nm).

4.5.4 Hiperalgesia mecânica induzida por histamina

Para avaliar o efeito direto da LEDT (830 ou 950 nm) sobre a hiperalgesia causada pela histamina, camundongos foram submetidos à injeção i.pl. de 20 µl de histamina (100 µg/pata, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) dissolvida em PBS (RIBEIRO-FILHO et al., 2014). Vinte e quatro horas após a administração de histamina os animais receberam a aplicação da LEDT (830 nm ou 950 nm, 2 J/cm²), sendo o grupo controle tratado com o dispositivo desligado. A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 1, 2 e 3 horas após aplicação da LEDT (830 ou 950 nm).

4.5.5 Hiperalgesia mecânica induzida por IGF-1

Para avaliar o efeito direto da LEDT (830 ou 950 nm) sobre a hiperalgesia causada pelo IGF-1, camundongos foram submetidos à injeção i.pl. de IGF-1 (1 µg/pata, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) (MIURA et al., 2011). Trinta minutos após a injeção os animais receberam a aplicação da LEDT (830 nm ou 950 nm, 2 J/cm²), sendo o grupo controle tratado com o dispositivo desligado. A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 30 minutos e 1 hora após o tratamento com a LEDT (830 ou 950 nm).

4.6 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para a coleta das amostras biológicas, todos os animais foram submetidos à eutanásia, 30 minutos após a aplicação da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²). Posteriormente, um segmento de aproximadamente 5 mm de tecido da pata posterior direita (pele, músculos e fáscia) foi removido com o auxílio de uma pinça e uma lâmina cirúrgica. As amostras foram coletadas 24 horas após a injeção i.pl. de CFA, 30 minutos após a aplicação da LEDT (experimento agudo); e no quinto dia após a injeção i.pl. de CFA e 30 minutos após a aplicação da LEDT (experimento crônico). Nas amostras coletadas foram quantificadas as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α) e de fator de crescimento (IGF-1), bem como as concentrações de marcador de estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (IL-1 β E TNF- α) E DE FATOR DE CRESCIMENTO (IGF-1)

As amostras de tecido das patas foram homogeneizadas com salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de 100 fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA, 10 mM), aprotinina (2 ng/ml), cloreto de benzetônio (0,1 mM). O homogenato foi transferido para tubos Eppendorf, centrifugados a 3000g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante obtido foi estocado a -80° C para posterior análises (BOBINSKI et al., 2011). A quantidade de proteínas foi medida no sobrenadante pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. Um volume de 100 μ l da amostra foi utilizado para mensurar a concentração de fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), usando kits de ELISA para citocinas (R&D Systems®, Minneapolis, Minnesota, EUA) e fator de crescimento (BioLegend®, San Diego, Califórnia, EUA) para camundongos de acordo com as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram estimados por meio da interpolação de uma curva padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico, medido à 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placas de ELISA (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Assim todos os resultados foram expressos em picogramas de citocinas ou IGF-1 por miligrama de proteína (BOBINSKI et al, 2011).

4.8 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

4.8.1 Análise de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS

Para verificar o efeito da LEDT no dano à lipídios induzido por CFA foi quantificada a formação de TBARS (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético a 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e, em seguida, aquecida em um banho de água fervente durante 15 minutos. TBARS foram determinadas pela absorbância a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído por miligrama de proteína (MDA, nmol/mg de proteína).

4.8.2 Quantificação da atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da catalase (CAT) foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm conforme previamente descrito (AEBI, 1984) e representada como unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480 nm conforme previamente descrito (BANNISTER; BANNISTER et al., 1987) e representada em unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

4.8.3 Determinação de proteínas totais

Todos os parâmetros bioquímicos foram normalizados para o teor de proteína, com albumina bovina como padrão. Todos os resultados foram normalizados pela concentração de proteína, medida pelo ensaio de Lowry (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram representados como unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* versão 5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados apresentados possuem uma distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro – Wilk ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas via seguido pelo teste pos-hoc de Student-Newman-Keuls ou Bonferroni quando apropriado, respectivamente. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

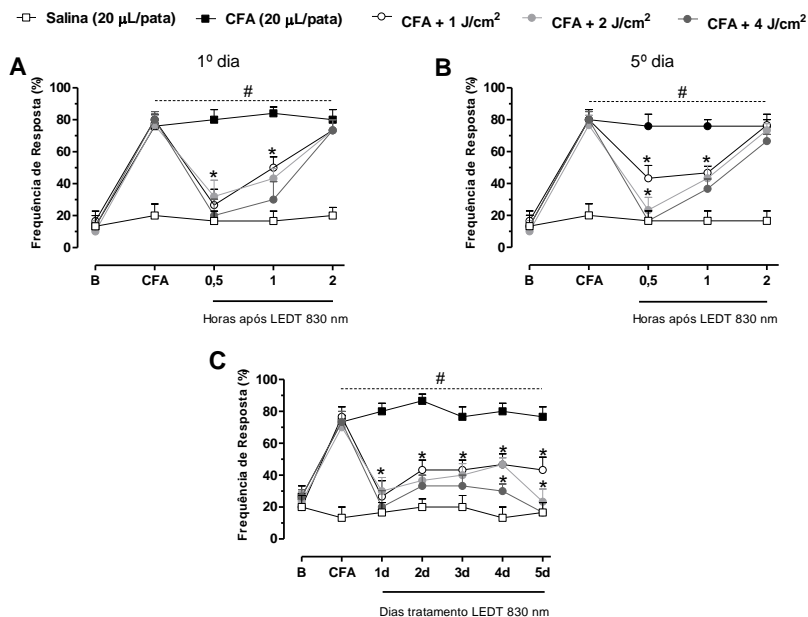
5.1 EFEITO DA LEDT 830 nm NA HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados apresentados na figura 3 (A-C) mostram que a injeção intraplantar (i.pl.) de CFA induziu hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral dos camundongos, do 1º ao 5º dia após o procedimento, em relação ao grupo salina (Fig. 3 C). Os resultados apresentados na figura 3 A e B demonstram que a LEDT 830 nm, aplicada diretamente sobre o local da injeção, nas fluências de 1, 2 e 4 J/cm², reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA, com duração do efeito por até uma hora, no 1º e 5º dia de experimento. No 1º dia, as porcentagens de inibição de 0,5 e 1 hora após o tratamento, para o grupo CFA + 1 J/cm² foram de $67 \pm 12\%$ e $40 \pm 8\%$, respectivamente. Para o grupo CFA + 2 J/cm² foram de $60 \pm 13\%$ e $48 \pm 7\%$, respectivamente. Assim como no grupo CFA + 4 J/cm², $75 \pm 13\%$ em 0,5 hora e $64 \pm 13\%$ em 1 hora (Fig. 3 A). No 5º dia, as porcentagens de inibição em 0,5 e 1 hora após o tratamento para o grupo CFA + 1 J/cm² foram de $43 \pm 11\%$ e $39 \pm 6\%$, respectivamente. Para o grupo CFA + 2 J/cm² foram de $69 \pm 11\%$ e $43 \pm 11\%$, respectivamente. Assim como no grupo CFA + 4 J/cm², $78 \pm 8\%$ em 0,5 hora e $52 \pm 8\%$ em 1 hora (Fig. 3 B).

A aplicação diária da LEDT (experimento crônico) reduziu a hiperalgesia mecânica em todos os dias de tratamento, com inibição máxima de $75 \pm 13\%$ no 1º dia após o CFA, no grupo CFA + 4 J/cm² (Fig. 3 C).

Uma vez que 2 J/cm² requer menos tempo de irradiação (50 segundos) e seu efeito não foi estatisticamente diferente do resultado obtido com a fluência de 4 J/cm² (100 segundos de irradiação), os experimentos subsequentes foram realizados com a fluência de 2 J/cm².

Figura 3 - Efeito da LEDT 830 nm na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA



Legenda: Efeito da LEDT 830 nm sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. Decurso temporal do efeito da aplicação aguda da LEDT (A e B). Efeito da aplicação diária da LEDT (C). “B” corresponde à avaliação antes da injeção i.pl. de CFA. Os dados são expressos como média \pm E.P.M., $n = 8$ animais. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina (20 μ L/pata); * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CFA (20 μ L/pata). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

5.2 EFEITO DA LEDT 950 nm NA HIPERALGESIA MECÂNICA

Os dados apresentados na figura 4 (A-C) confirmam os resultados obtidos anteriormente e mostram que o CFA causou hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral dos camundongos, do 1º ao 5º dia após sua administração, quando comparado com o grupo salina (20 μ L/pata) (Fig. 4 C).

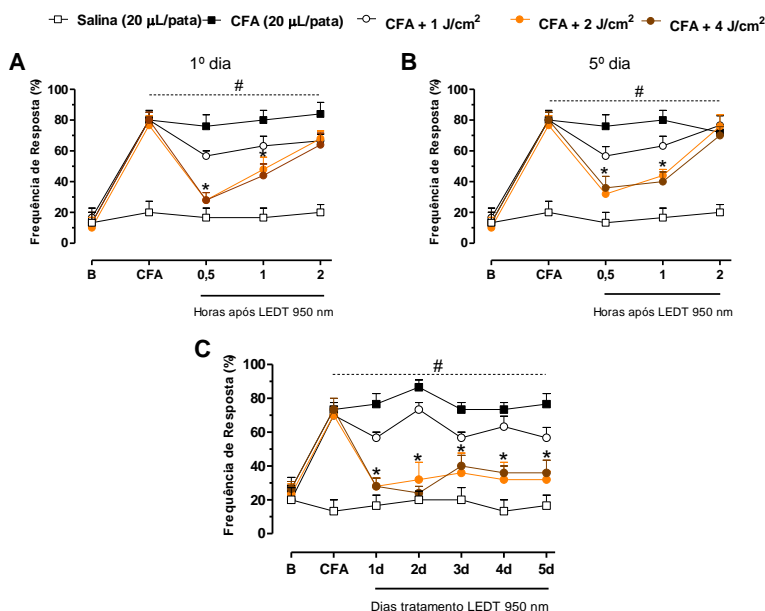
Além disso, pode-se observar na figura 4 (A e B) que a LEDT 950 nm, aplicada diretamente sobre o local da injeção, nas fluências de 2 e 4 J/cm², reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica, com duração

do efeito por até uma hora, no 1º e 5º dia de experimento. No entanto, a aplicação de 1 J/cm² não reduziu a hiperalgesia mecânica (Fig. 4 A e B). No 1º dia, as porcentagens de inibição em 0,5 e 1 hora após a aplicação no grupo CFA + 2 J/cm² foram de $63 \pm 6\%$ e $40 \pm 10\%$, respectivamente. Assim como no grupo CFA + 4 J/cm², $58 \pm 6\%$ em 0,5 hora e $45 \pm 9\%$ em 1 hora (Fig. 4 A). No 5º dia, as porcentagens de inibição de 0,5 e 1 hora após a aplicação no grupo CFA + 2 J/cm², foram de $58 \pm 6\%$ e $45 \pm 5\%$, respectivamente. Assim como no grupo CFA + 4 J/cm², $53 \pm 10\%$ em 0,5 hora e $50 \pm 8\%$ em 1 h (Fig. 4 B).

A aplicação diária (experimento crônico) com a LEDT reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por injeção i.pl. de CFA em todos os dias de aplicação, com inibição máxima de $73 \pm 4\%$ no 2º dia após o CFA, no grupo CFA + 4 J/cm² (Fig. 4 C).

Novamente, uma vez que 2 J/cm² requer menos tempo de irradiação (25 segundos) e seu efeito não diferiu estatisticamente do resultado obtido com a fluência de 4 J/cm² (50 segundos de irradiação), os experimentos subsequentes foram realizados com a fluência de 2 J/cm².

Figura 4 - Efeito da LEDT 950 nm na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA



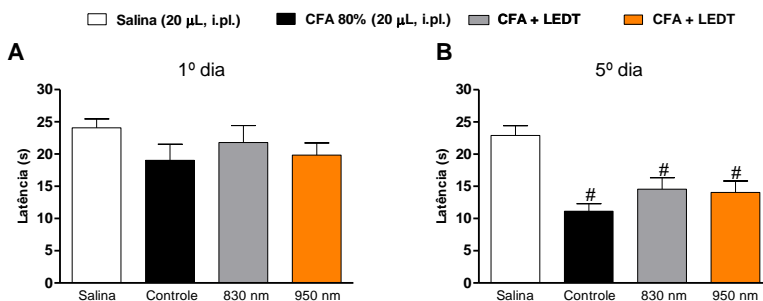
Legenda: Efeito da LEDT 950 nm sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. Decurso temporal do efeito da aplicação aguda da LEDT (A e B). Efeito da aplicação diária da LEDT (C). “B” corresponde à avaliação antes da injeção i.pl. de CFA. Os dados são expressos como média \pm E.P.M., $n = 8$ animais. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina (20 µl/pata); * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CFA (20 µl/pata). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

5.3 EFEITO DA LEDT NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR

Os resultados apresentados na figura 5 (A-B) demonstram que a injeção i.pl. de CFA induziu hiperalgesia térmica, caracterizada pela redução da latência de retirada da pata frente ao estímulo térmico (48° C), somente no 5º dia após a injeção de CFA quando comparado ao grupo salina (20 µl/pata) (Fig. 5 B). Além disso, pode-se observar que a aplicação da LEDT não foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica ao calor induzida pelo CFA no 1º e 5º dias de experimento, avaliados 30

minutos após as aplicações de LEDT, quando comparado com o grupo controle (Fig. 5 A-B).

Figura 5 - Efeito da LEDT na hiperalgesia térmica ao calor induzida pela injeção i.pl. de CFA

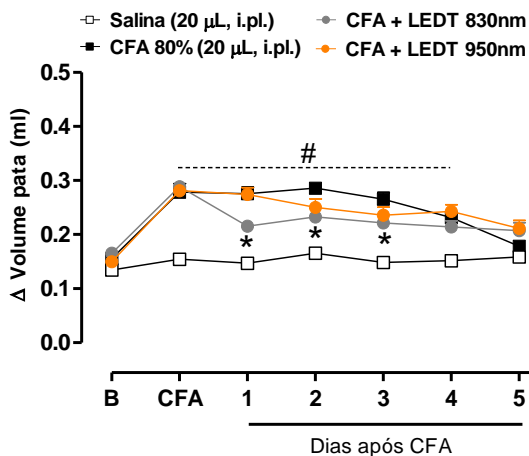


Legenda: Efeito da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida por injeção i.pl. de CFA em camundongos. Os dados são expressos como média ± E.P.M., n = 8 animais. [#]*p*<0,05 quando comparado com o grupo salina (20 µl/pata); **p*<0,05 quando comparado com o grupo CFA (20 µl/pata). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

5.4 EFEITO DA LEDT NO EDEMA DE PATA

Os resultados apresentados na figura 6 demonstram que a injeção i.pl. de CFA induziu edema na pata ipsilateral dos camundongos, do 1º ao 4º dia após o procedimento, quando comparados com o grupo salina (20 µl/pata). Além disso, pode-se observar que a aplicação da LEDT 830 nm, na fluência de 2 J/cm², reduziu significativamente (*p*<0,05) o edema na pata, no 1º, 2º e 3º dia de experimento, com inibições de 20 ± 2%, 17 ± 4% e 15 ± 3% quando comparado com o grupo CFA (80%), respectivamente. No entanto, a aplicação da LEDT 950 nm, na fluência de 2 J/cm², não alterou o edema formado pela administração de CFA.

Figura 6 - Efeito da LEDT no edema de pata induzido por injeção i.pl. de CFA



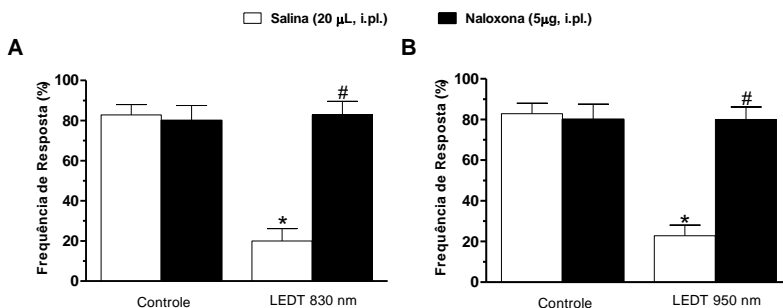
Legenda: Efeito da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) no edema de pata induzido pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. Aplicação diária da LEDT. “B” corresponde à avaliação antes da injeção de CFA. Os dados são expressos como média ± E.P.M., n = 8 animais. #*p*<0,05 quando comparado com o grupo salina (20 μl/pata); **p*<0,05 quando comparado com o grupo CFA (20 μl/pata). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

5.5 ANÁLISE DO MECANISMO FOTOBIOLOGICO DA LEDT

5.5.1 Envolvimento dos receptores opioides

A figura 7 A e B demonstra que a LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por injeção i.pl. de CFA quando comparado com o grupo controle. Entretanto, a administração prévia de naloxona (um antagonista não seletivo para receptores opioides) por via i.pl. (5 μg/pata), preveniu (*p*<0,05) o efeito anti-hiperalgésico da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) quando comparado com o grupo LEDT que recebeu salina. Além disso, pode-se observar que a administração de naloxona não causou nenhum efeito *per se* na hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA quando comparado com o grupo que recebeu salina (Fig. 7 A e B).

Figura 7 - Envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico da LEDT

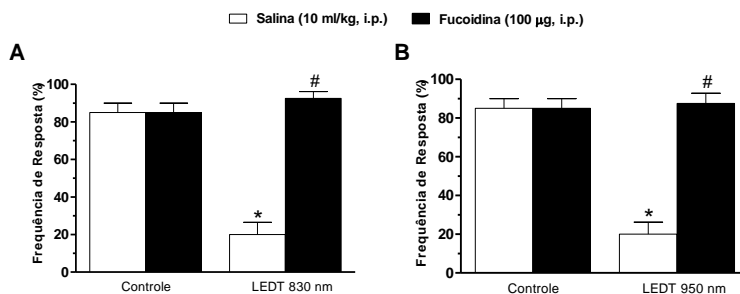


Legenda: Efeito da pré-administração de naloxona sobre o efeito anti-hiperalgésico da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) após injeção i.pl. de CFA em camundongos. Naloxona administrada por via i.pl. (5 μ g/pata). Os dados são expressos como a média \pm EPM, n = 8 animais. # p <0,05 quando comparado com o grupo naloxona + LEDT; * p <0,05 indica diferença quando comparado com o grupo controle sem aplicação da LEDT. A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.5.2 Envolvimento de opioides liberados por leucócitos

Os dados apresentados na figura 8 A e B mostram que a LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA quando comparado com o grupo controle. Além disso, pode-se observar que a pré-administração sistêmica de fucoidina (100 μ g/kg, i.p.) inibiu de forma significativa (p <0,05) o efeito analgésico da LEDT quando comparado com o grupo controle. No entanto, a administração de fucoidina *per se* não afetou de forma significativa (p >0,05) a hiperalgesia mecânica quando comparada com o grupo controle CFA (Fig. 8 A e B).

Figura 8 - Envolvimento de opióides liberados por leucócitos no efeito anti-hiperalgésico da LEDT

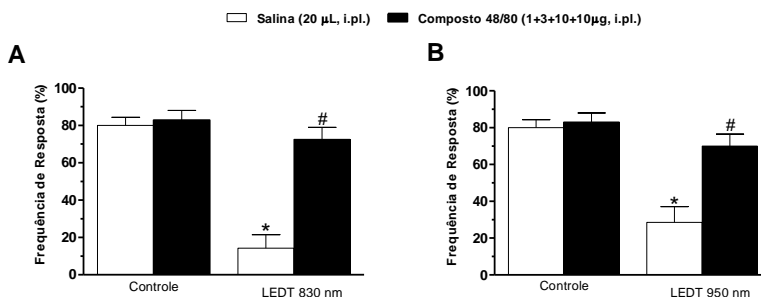


Legenda: Efeito da pré-administração sistêmica de fucoidina no efeito anti-hiperalgésico da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) após injeção i.pl. de CFA em camundongos. Os dados são expressos como a média ± E.P.M., n = 8 animais. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo LEDT; * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle sem aplicação da LEDT. A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.5.3 Envolvimento de mastócitos

Na figura 9 A e B, os resultados apresentados indicam que a LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA quando comparado com o grupo controle. No entanto, a pré-administração local do composto 48/80 reverteu de forma significativa ($p < 0,05$) o efeito anti-hiperalgésico da LEDT. Além disso, a administração do composto 48/80 *per se* não afetou de forma significativa ($p > 0,05$) a hiperalgesia mecânica quando comparada com o grupo controle CFA (Fig. 9 A e B).

Figura 9 - Envolvimento de mastócitos na inflamação induzida por injeção i.pl. de CFA

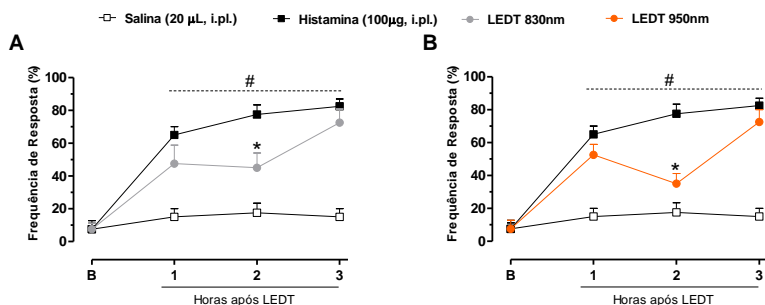


Legenda: Efeito da pré-administração local do composto 48/80 no efeito anti-hiperalgésico da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) após injeção i.pl. de CFA em camundongos. Os dados são expressos como a média ± E.P.M., n = 8 animais. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo LEDT; * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle sem aplicação da LEDT. A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.5.4 Efeito da LEDT na hiperalgesia mecânica induzida pela histamina

Os resultados apresentados na figura 10 A e B mostram que a injeção i.pl. de histamina (100 µg/pata) induziu hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral dos camundongos, 24 horas após a sua administração, quando comparada com o grupo salina. A aplicação da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a hiperalgesia mecânica somente na 2ª hora após a aplicação da LEDT quando comparada com o grupo histamina (Fig. 10 A e B), com porcentagem de inibição na 2ª hora de $42 \pm 12\%$ para 830 nm e $52 \pm 9\%$ para 950 nm.

Figura 10 - Efeito da LEDT na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de histamina

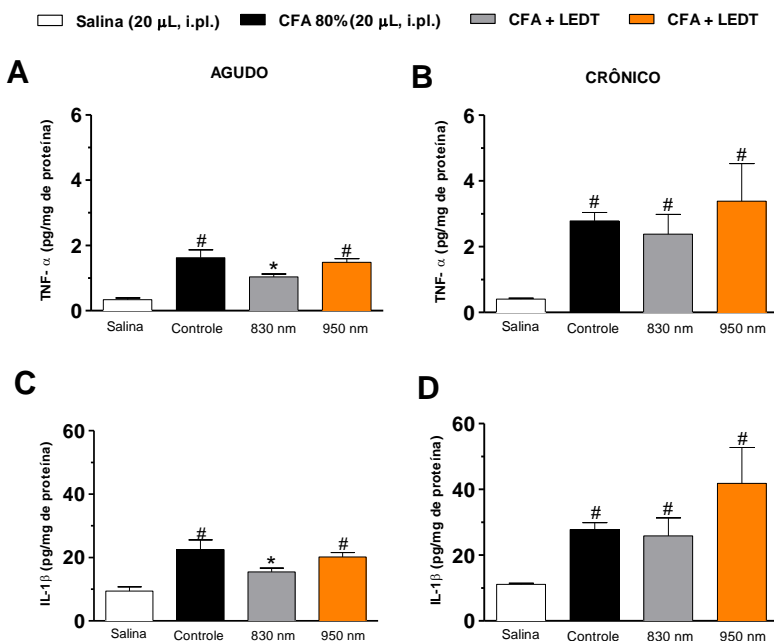


Legenda: Efeito da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de histamina. Os dados são expressos como a média \pm E.P.M., n = 8 animais. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina; * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle sem aplicação da LEDT. A estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

5.6 EFEITO DA LEDT NAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Os dados apresentados na figura 11 demonstram que a injeção de CFA na pata ipsilateral dos camundongos, causou aumento significativo da concentração de TNF- α (Fig. 11 A e B, $p < 0,05$) e IL-1 β (Fig. 11 C e D, $p < 0,05$) quando analisado no 1º (agudo) e 5º (crônico) dia após a injeção de CFA e comparados com o grupo salina. A aplicação da LEDT 830 nm, quando comparado ao grupo controle CFA, diminuiu significativamente a concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no 1º dia após a injeção i.pl. de CFA (Fig. 11 A e C, $p < 0,05$). No entanto, a aplicação da LEDT 830 nm não influenciou a concentração de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no 5º dia após a injeção de CFA (Fig. 11 B e D, $p > 0,05$), assim como, a LEDT 950 nm não interferiu na concentração dessas citocinas no 1º e 5º dia após CFA (Fig. 11 A, B, C e D, $p > 0,05$).

Figura 11 - Efeito da LEDT sobre citocinas pró-inflamatórias



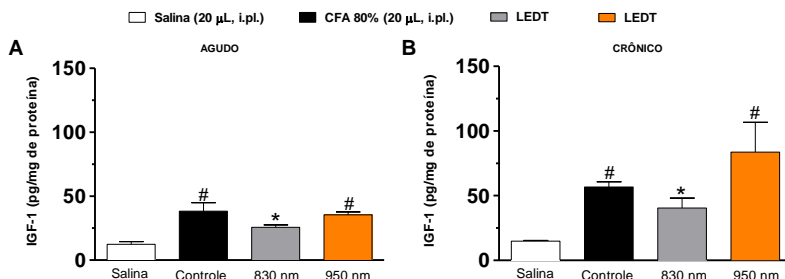
Legenda: Efeito da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) sobre a concentração de citocinas nos tecidos da pata de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA, no 1º (agudo) e 5º (crônico) dia de experimento: TNF- α (A-B) e IL-1 β (C-D). Os dados são expressos como a média \pm E.P.M., n = 8 animais. [#] $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina; ^{*} $p < 0,05$ quando comparado com os grupos controle CFA. A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.7 EFEITO DA LEDT SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IGF-1

Os dados apresentados na figura 12 A e B demonstram que os animais do grupo controle, quando comparados com o grupo salina, apresentaram maior concentração de IGF-1 quando analisado no 1º (agudo) e 5º (crônico) dia após a injeção de CFA e comparados com o grupo salina. A aplicação da LEDT 830 nm, diminuiu significativamente a concentração de IGF-1 no 1º e 5º dia após a injeção i.pl. de CFA, quando comparado ao grupo controle CFA (Fig. 12 A e B). No entanto, a

aplicação da LEDT 950 nm não alterou a concentração de IGF-1 nem no 1º dia quanto no 5º dia após a injeção i.pl. de CFA (Fig. 12 A e B).

Figura 12 - Efeito da LEDT sobre a concentração de IGF-1

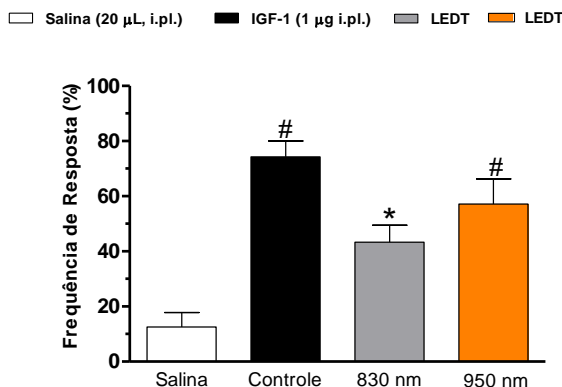


Legenda: Efeito da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) sobre a concentração de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) nos tecidos da pata de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA, no 1º (agudo) e 5º (crônico) dia de experimento. Os dados são expressos como a média ± E.P.M., n = 8 animais. #*p*<0,05 quando comparado com o grupo salina; **p*<0,05 quando comparado com o controle CFA. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.8 EFEITO DA LEDT NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR IGF-1

Os resultados apresentados na figura 13 demonstram que a injeção i.pl. de IGF-1 (1 µg/pata) induziu hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral dos camundongos, 30 minutos após o procedimento, em relação ao grupo salina. A aplicação da LEDT 830 nm reduziu significativamente (*p*<0,05) a hiperalgesia mecânica induzida por injeção i.pl. de IGF-1, quando avaliado 30 minutos após a aplicação. Diferentemente da aplicação da LEDT 950 nm, que não foi capaz de reduzir significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por injeção i.pl. de IGF-1 (Fig. 13).

Figura 13 - Efeito da LEDT na hiperalgesia mecânica induzida injeção i.pl. por IGF-1

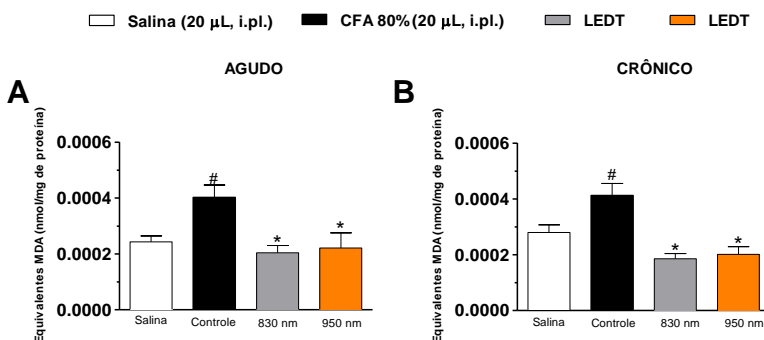


Legenda: Efeito da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1, 1µg, i.pl.) Os dados são expressos como a média ± E.P.M., n = 8 animais. #*p*<0,05 quando comparados com o grupo salina; **p*<0,05 quando comparado com o controle IGF-1. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.9 EFEITO DA LEDT NO DANO OXIDATIVO

Os resultados da figura 14 A e B demonstram que os animais do grupo controle CFA, em comparação com o grupo salina, apresentaram maiores níveis de equivalentes de malondialdeído (MDA) (Fig. 14 A e B, *p*<0,05) no 1º e 5º dia após a injeção i.pl. de CFA. Quando comparado com o grupo controle, as aplicações da LEDT 830 ou 950 nm diminuiu significativamente os níveis de equivalentes MDA no 1º e 5º dia após a injeção i.pl. de CFA (Fig. 14 A e B, *p*<0,05).

Figura 14 - Efeito da LEDT no dano oxidativo



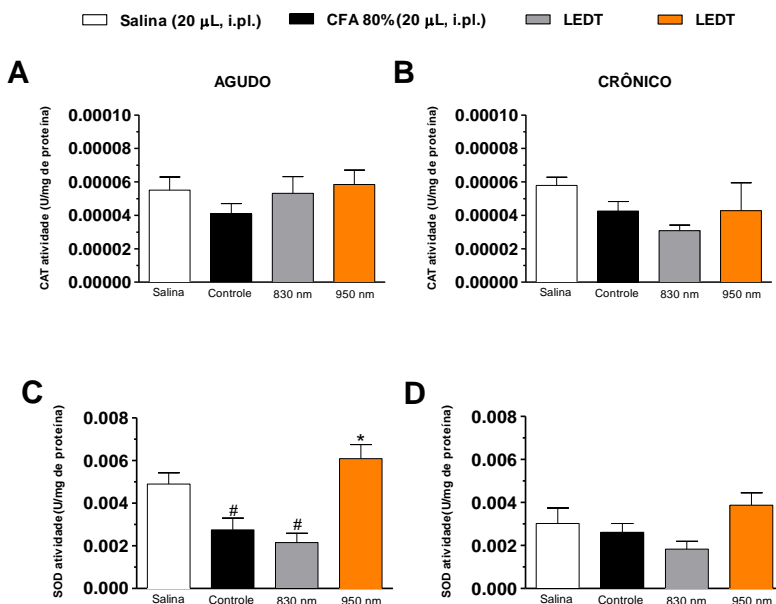
Legenda: Efeito da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) nos níveis de dano oxidativo nos tecidos da pata de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA, no 1º (agudo) e 5º (crônico) dia de experimento. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (equivalentes MDA; A-B). Os dados são expressos como a média \pm E.P.M., n = 8 animais. [#] $p < 0,05$ quando comparado como o grupo salina; ^{*} $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle CFA. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.10 EFEITO DA LEDT NO SISTEMA ANTIOXIDANTE

Os dados apresentados na figura 15 A e B demonstram que os animais do grupo controle, em comparação com o grupo salina, não apresentaram mudanças na atividade da enzima catalase ($p < 0,05$) no 1º e 5º dia após a injeção i.pl. de CFA. Do mesmo modo, a aplicação da LEDT 830 ou 950 nm não influenciou a atividade da catalase após a injeção i.pl. de CFA (Fig. 15 A e B).

A figura 15 C e D demonstram que os animais do grupo controle, em comparação com o grupo salina, apresentaram menor atividade da enzima superóxido dismutase, no 1º dia após a injeção i.pl. de CFA ($p < 0,05$). Somente o tratamento com a LEDT 950 nm foi capaz de aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase, no 1º dia de experimento (Fig. 15 C, $p < 0,05$).

Figura 15 - Efeito da LEDT no sistema antioxidante



Legenda: Efeito da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) no sistema antioxidante nos tecidos da pata de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA, no 1º (agudo) e 5º (crônico) dia de experimento. Atividade da catalase (CAT atividade; A-B) e atividade da superóxido dismutase (SOD atividade; C-D). Os dados são expressos como a média ± EPM, n = 8 animais. #*p*<0,05 quando comparado como o grupo salina; **p*<0,05 quando comparado com o grupo controle CFA. A estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

6 DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram, pela primeira vez, que a aplicação da LEDT nos dois comprimentos de onda (830 ou 950 nm), foi capaz de reduzir significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. Esse efeito anti-hiperalgésico da LEDT foi de forma dependente da fluência, não cumulativo e também a LEDT não induziu tolerância. Ademais, a LEDT 830 nm foi efetiva em todas as fluências aplicadas (1, 2 e 4 J/cm²), diferentemente da LEDT 950 nm, a qual não apresentou redução significativa na hiperalgesia mecânica na fluência de 1 J/cm².

Em fototerapia, quanto maior o comprimento de onda, maior a profundidade de penetração de seu feixe nos tecidos, enquanto a irradiância é basicamente a energia emitida pelo feixe de luz por unidade de área (MEINHARDT et al., 2008; ENWEMEKA, 2009). Neste sentido, estudos indicam a existência de uma “janela de atuação terapêutica”, entre os comprimentos de onda de 600 nm e 1200 nm (NIEMZ, 2007; BAROLET, 2008). Tal evidência se deve ao fato que a estimulação fotônica em comprimentos de onda localizados nesse espectro, no caso das radiações vermelha e infravermelha, penetram nos tecidos biológicos com menor perda, atingindo estruturas mais profundas, podendo alterar a expressão de genes envolvidos na cicatrização de tecidos e inibindo a transmissão dolorosa (EELLS et al., 2004).

Embora a aplicação da LEDT 830 nm tenha apresentado eficácia em todas as fluências utilizadas, os dois comprimentos de onda apresentaram redução da hiperalgesia mecânica e, uma vez que 2 J/cm² requereu menos tempo de irradiação (100 segundos para 830 nm e 25 segundos para 950 nm) e seu efeito não diferiu estatisticamente do resultado obtido com a fluência de 4 J/cm² (200 segundos para 830 nm e 50 segundos para 950 nm), os experimentos subsequentes foram realizados com a fluência de 2 J/cm².

O efeito anti-hiperalgésico da aplicação da LEDT 950 nm (2,5 J/cm²) foi inicialmente demonstrado por Cidral-Filho e colaboradores (2013), utilizando o mesmo dispositivo de LED e fluência. Eles demonstraram que a terapia foi eficaz em reduzir a hiperalgesia mecânica em um modelo de dor neuropática (esmagamento do nervo isquiático) e inflamatória (incisão plantar – dor pós-operatória; síndrome da dor complexa regional do tipo-1) em camundongos. Do mesmo modo, outros autores demonstraram que a aplicação da LEDT 830 nm também reduz a dor e acelera a cicatrização de feridas oftálmicas causada pela *herpes*

zoster em humanos, resultado atribuído aos seus efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes (PARK et al., 2013).

Um importante estudo fez uma interessante descoberta sobre o perfil da inflamação induzida por CFA. Descobriu-se que 24 horas após a injeção i.pl. de CFA, há acentuada migração de neutrófilos no local da injeção (pata), sendo esse aumento 27 vezes maior em relação as condições normais, enquanto que o número de mastócitos, linfócitos/macrófagos, permaneceu similar ao grupo que recebeu injeção i.pl. de salina (MEOTTI et al., 2006). Considerando que os neutrófilos secretam mediadores capazes de induzir hiperalgesia, é plausível sugerir que essas células, por meio da produção de citocinas e outros mediadores, estejam envolvidas na gênese da dor durante o processo inflamatório. Porém, a hiperalgesia inflamatória não pode ser atribuída exclusivamente à presença de neutrófilos no foco inflamado, haja vista que outras células liberam mediadores inflamatórios relacionados ao desenvolvimento de hiperalgesia (NOGUEIRA, 2011).

Outro interessante resultado do presente estudo foi que a aplicação de LEDT 830 ou 950 nm com 2 J/cm² não foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor induzida por injeção i.pl. de CFA, demonstrando que sua eficácia na redução da hiperalgesia térmica é limitada. Por outro lado, autores demonstraram que os mecanismos envolvidos na hiperalgesia térmica ao calor causada pelo CFA, dependem, pelo menos em parte, da participação do óxido nítrico, que é um importante mensageiro intracelular e potente mediador da inflamação (GOMES; DALMARCO; ANDRE, 2012). Além disso, foi demonstrado, por meio de diferentes abordagens experimentais, que o NO na periferia é um mediador-chave nos fenômenos que envolvem a resposta nociceptiva (SCHMIDTKO; TEGEDER; GEISLINGER, 2009). De fato, essas observações foram comprovadas por alguns autores, que mostraram que animais *knockout* para diferentes isoformas da NO sintase (NOS), enzima chave na síntese de NO, como a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS), apresentaram reduções significativas na hiperalgesia térmica induzida pelo CFA (BOETTGER et al, 2007; LEANEZ; HERVERA; POL, 2009). Ademais, o pré-tratamento com L-NG-Nitroarginina Metil Ester (L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS) foi capaz de atenuar de forma significativa a hiperalgesia térmica induzida por CFA em camundongos (CHEN et al., 2010).

Diversos estudos mostram que a terapia fotônica de baixa intensidade reduz a expressão de NO de uma maneira dependente da dose (MORIYAMA et al., 2009; GOMES; DALMARCO; ANDRE, 2012;

HUANG; LU; KAO, 2012, SONG et al., 2012). Assim como os dados apresentados por Cidral-Filho e colaboradores (2013), que sugerem que um dos mecanismos possíveis da analgesia induzida pela LEDT seja a diminuição da concentração de NO no processo inflamatório, uma vez que o efeito da LEDT foi prevenido pela pré-administração de L-arginina (um precursor do NO). Em consonância com esse estudo, sugere-se que a LEDT 830 ou 950 nm possa reduzir a hiperalgesia térmica ao calor causada pelo CFA por diminuir a concentração local de NO.

No intuito de avaliar o efeito da aplicação da LEDT no processo inflamatório, o edema da pata foi também avaliado, pelo fato que o edema também é um sinal presente na inflamação induzida pelo CFA em roedores. Assim, o modelo utilizado nesse estudo possui grande similaridade com doenças crônicas inflamatórias presentes em humanos, visto que a injeção i.pl. de CFA produz migração celular, edema e hiperalgesia intensa e persistente (WOOLF; COSTIGAN, 1999). Embora o CFA produza uma resposta inflamatória marcante dentro de poucas horas após sua administração, é um agente utilizado para avaliar a dor persistente, pois age tanto na sensibilização dos neurônios periféricos (pois possui uma ação direta, sem a participação de prostanóides), quanto por meio da sensibilização central de neurônios na medula espinal (WOOLF; MA, 2007). Os resultados encontrados no presente estudo mostram que, somente a aplicação da LEDT 830 nm, na fluência de 2 J/cm², reduziu significativamente o edema da pata induzido pelo CFA. Interessantemente, a aplicação da LEDT 950 nm não reduziu o edema da pata, evidenciando que esse comprimento de onda não apresenta o mesmo efeito anti-inflamatório que o demonstrado pela LEDT 830 nm.

Em paralelo a esses resultados, também foi demonstrado que a injeção i.pl. de CFA aumentou as concentrações de TNF- α e IL-1 β no 1º e 5º dia após a sua administração. Além disto, foi observado que a aplicação da LEDT 830 nm diminuiu significativamente as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1- β no 1º dia após a injeção i.pl. de CFA, porém, o tratamento com a LEDT 950 nm não influenciou a concentração dessas citocinas. Evidências anteriores também sugerem que a LEDT 830 nm diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) e, adicionalmente, de mediadores inflamatórios (leucotrienos e prostaglandinas), assim como aumenta a quimiotaxia e atividade fagocitária de leucócitos e macrófagos (RUSSELL; KELLETT; REILLY, 2005), evidências essas que corroboram à sua atividade e eficácia anti-inflamatória.

As citocinas podem atuar via receptores específicos induzindo uma diminuição da cascata de transdução de sinal que modula a função de outros receptores, como o receptor ionotrópico para glutamato NMDA, receptor vaniloide de potencial transitório (TRPV) ou canais de sódio. Essa ativação amplifica a resposta inflamatória ou facilita a ativação de canais iônicos que resultam na sensação de dor. Um desequilíbrio na produção de citocinas anti- e pró-inflamatórias pode ser um fator importante para a suscetibilidade individual à dor (UÇEYLER; SCHÄFFERS; SOMMER, 2009).

Diversas células do sistema imune estão envolvidas na superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a inflamação crônica (KUMAR; PERKINS, 2010). Os radicais livres são conhecidos por serem capazes de induzir alterações químicas e moleculares no DNA, em nucleotídeos, proteínas, lipídios, hidrocarbonetos e na estrutura da membrana celular (SLATER, 1984; SORG, 2004). Desta forma, sabe-se que os marcadores de estresse oxidativo encontram-se elevados em muitas doenças, entretanto, a associação mais expressiva é com a inflamação (CODERRE; BENNETT, 2010). Neste sentido, a redução na atividade de enzimas antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica são consistentes com aumento dos níveis de estresse oxidativo. Contudo, em alguns casos pode-se encontrar também um aumento na atividade de enzimas antioxidantes associado ao estresse oxidativo (BLAKE; KROGER, 2000).

No presente estudo foi mostrado que os animais tratados com CFA apresentaram aumento da concentração de equivalentes de MDA no 1º e 5º dia após a sua administração em comparação com o grupo salina, corroborando com estudos prévios, que mostram que o CFA aumenta a peroxidação lipídica (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO et al., 2015; SINGH; VINAYAK, 2014). Já o tratamento com a LEDT de 830 ou 950 nm foi capaz de reduzir significativamente a concentração de equivalentes de MDA no 1º e 5º dia após a injeção i.pl. de CFA. Por outro lado, a aplicação da LEDT 830 ou 950 nm não influenciou a atividade da enzima catalase e, somente no comprimento de onda de 950 nm e no 1º dia de experimento, houve aumento da atividade da enzima superóxido dismutase.

Em consonância com os dados aqui apresentados, estudos prévios têm demonstrado que a LEDT, além de atividade analgésica e anti-inflamatória, demonstrou efeito antioxidante, reduzindo os marcadores de estresse oxidativo em modelos animais de neuropatia (FITZGERALD et al., 2010; ISHIGURO; IKEDA; TOMITA, 2010), diabetes crônica (LIM

et al., 2009) e SDCR-1, além de restabelecer o sistema antioxidante enzimático (SOD e CAT) (CIDRAL-FILHO, 2013).

Visando elucidar os mecanismos neurobiológicos envolvidos no efeito anti-hiperalgésico induzido pela aplicação da LEDT, os dados apresentados aqui demonstram que o efeito analgésico da LEDT foi dependente da ativação de receptores opioides periféricos. Essa observação foi baseada no fato de que a administração de naloxona (um antagonista não seletivo para receptores opioides) preveniu de forma significativa o efeito da aplicação da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²) na hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA. Assim, esses resultados estão de acordo com o trabalho de Cidral-Filho e colaboradores (2013), onde se mostrou que a atividade anti-hiperalgésica induzida pela LEDT 950 nm em diferentes modelos animais, tais como lesão nervosa, incisão plantar e SDCR-1, também é mediada pelos receptores opioides periféricos. Entretanto, a naloxona é um antagonista não seletivo e, deste modo, pode antagonizar todos os três tipos principais de receptores opioides (μ , δ e κ) que estão presentes em terminais dos nervos sensoriais periféricos tanto em animais quanto em seres humanos (STEIN; LANG, 2009). Deste modo, estudos adicionais são necessários para determinar quais os tipos de receptores opioides estão envolvidos na ação anti-hiperalgésica induzida pela LEDT. Além disto, é importante mencionar que diversas terapias complementares como atividade física, acupuntura, crioterapia e eletroterapia têm se mostrado eficazes no aumento da liberação de opioides endógenos, principalmente β -endorfina (BENDER et al., 2007).

Outra constatação do presente estudo foi o experimento que permitiu especular uma possível fonte de opioides endógenos que interagem com seus respectivos receptores produzindo ação anti-hiperalgésica, os leucócitos. No presente estudo, o efeito anti-hiperalgésico da LEDT também foi prevenido pela pré-administração de fucoidina, uma substância que se liga fortemente às selectinas bloqueando o rolamento de leucócitos, reduzindo seu acúmulo no sítio inflamatório (STEIN; LANG, 2009). Está bem estabelecido que a fucoidina inibe a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, por se ligarem às moléculas de adesão L e P-selectinas, induzindo uma inibição das mesmas e, conseqüentemente, impedindo o rolamento de leucócitos (SHIMAOKA et al., 1996; CUNHA et al., 2008). Os leucócitos que migram para o tecido inflamado podem ser estimulados pelo fator liberador de corticotropina (CRF), IL-1 β e/ou noradrenalina (NA) que, por sua vez, estimula a liberação de opioides por ativação de seus respectivos receptores encontrados na superfície dos leucócitos. Os

opioides liberados ligam-se à receptores presentes nos nociceptores periféricos, diminuindo a excitabilidade desses neurônios, levando à ação anti-hiperalgésica (KRAUS et al, 2009). Todas as diferentes famílias de peptídeos opioides são encontradas em leucócitos (endorfinas, encefalinas e dinorfinas), sendo que esses peptídeos podem se ligar a todos os três receptores opioides clássicos, com diferentes afinidades (RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2005).

Outra importante célula presente no processo inflamatório é o mastócito. Durante as respostas inflamatórias periféricas os mastócitos são a principal fonte de histamina e outros mediadores que sensibilizam os nociceptores e produzem hiperalgisia (REN; DUBNER, 2010). Deste modo, investigou-se a relação do efeito anti-hiperalgésico da LEDT sobre o mastócito e/ou seus mediadores. Assim, foi demonstrado que a pré-administração local do composto 48/80 (uma droga que causa depleção dos mediadores dos mastócitos produzida pelo pré-tratamento repetido) preveniu de forma significativa o efeito anti-hiperalgésico da aplicação da LEDT.

Os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo e, após sua degranulação, liberam mediadores inflamatórios como a histamina, a serotonina e a triptase, ativando seus respectivos receptores H_1 , 5-HT ou receptor ativado por protease 2 (PAR-2), que estão presentes em nociceptores, promovendo nocicepção (REN; DUBNER, 2002). Acredita-se que a ação anti-hiperalgésica induzida pela LEDT, nesse modelo, seja mediada por essas células, já que quando é induzida sua degranulação e liberação de mediadores pró-algésicos, a LEDT deixa de apresentar sua eficácia anti-hiperalgésica.

Além da hiperalgisia primária, a histamina também participa da hiperalgisia secundária através da inflamação neurogênica, ocorrendo ativação antidrômica de nociceptores pelo reflexo axônico, resultando na liberação de CGRP e SP pelas terminações periféricas de nociceptores. A SP se acopla a receptores específicos (NK1), causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e degranulação de mastócitos. Os mastócitos liberam histamina, que amplia o processo vascular e sensibiliza os nociceptores. Este mecanismo ocorre no local da lesão, mas também atinge regiões íntegras do tecido, causando hiperalgisia secundária (COUTAUX et al., 2005).

No presente estudo, a injeção i.pl. de histamina provocou hiperalgisia mecânica que foi reduzida pela aplicação local da LEDT (830 ou 950 nm, 2 J/cm²), sugerindo que o efeito da LEDT possa estar relacionado com o bloqueio de receptores histamínicos relacionados com

a dor, como H_1 e H_2 , ou ativação de receptores histamínicos que atuam reduzindo o processo doloroso, como H_3 e H_4 , que foi recentemente descoberto e especula-se que desempenhe um papel na regulação da resposta inflamatória (ROCHE; RODRÍGUEZ SARMINENTO, 2007). Quando liberada, a histamina pode agir em receptores H_1 e H_2 , produzindo vasodilatação em arteríolas e vênulas e aumento da permeabilidade vascular, com consequente extravasamento de líquido e proteínas para os tecidos perivasculares e formação de edema, componentes essenciais na formação e cronificação do processo inflamatório. Quando liberada periféricamente, a histamina pode induzir a liberação, por fibras aferentes primárias, de vários mediadores inflamatórios relacionados com a dor, como a SP e CGRP (YOSHIDA et al., 2005). Desse modo, sugere-se que a eficácia anti-inflamatória e anti-hiperalgésica da LEDT envolva a modulação de receptores histaminérgicos, porém, estudos adicionais são necessários para confirmar este envolvimento.

Além da histamina, outros mediadores estão envolvidos na sinalização nociceptiva e hiperexcitabilidade neural, como o IGF-1, que quando produzido no tecido em resposta à lesão tecidual, sensibiliza neurônios aferentes primários via seu receptor, IGF-1R, e produz hipersensibilidade dolorosa (MIURA et al., 2011). Alguns experimentos *in vitro* têm demonstrado que IGF-1 pode levar à sensibilização de neurônios aferentes primários nociceptivos por modular a função de receptores vaniloide de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1), aumentando a sensibilidade do receptor e translocação do citosol para a membrana (VAN BUREN et al., 2005). Outro estudo demonstrou que a injeção local de IGF-1 induz hipersensibilidade dolorosa após estimulação térmica e mecânica, assim como o aumento nas concentrações teciduais de IGF-1 no modelo animal de dor pós-operatória (MIURA et al., 2011).

Corroborando com os estudos supracitados, em que o IGF-1 pode levar à sensibilização neuronal, os dados encontrados aqui demonstram que a injeção i.pl. de CFA induz aumento da concentração de IGF-1 na pata dos animais, tanto no 1º quanto no 5º dia após sua administração. Zhang e colaboradores (2014) mostraram que o IGF-1 aumenta as correntes dos canais de cálcio tipo T através da ativação do IGF-1R, que é acoplado a uma proteína G dependente da via $PKC\alpha$, aumentando assim a excitabilidade de neurônios no DRG e a sensibilidade à dor (ZHANG et al., 2014). A inibição da sinalização do IGF-1R ou *knocking down* de Cav3.2 ou $PKC\alpha$ em neurônios do DRG aboliu o aumento da

sensibilidade mecânica e térmica em camundongos expostos à modelos de inflamação crônica da pata (STEMKOWSKI; ZAMPONI, 2014), sugerindo que a regulação de IGF-1R pode ser um potencial alvo terapêutico no manejo clínico da dor (ZHANG et al., 2014). Esse processo oferece um novo caminho para o desenvolvimento de terapias analgésicas mais eficazes e com menos efeitos colaterais, como a LEDT.

Avaliando os dados apresentados, em relação ao grupo controle, a LEDT 830 nm diminuiu significativamente a concentração de IGF-1 no 1º e 5º dia após a injeção i.pl. de CFA. Diferentemente da LEDT 950 nm, que não influenciou a concentração de IGF-1 nas mesmas condições. Desse modo, como a LEDT 830 nm reduziu a concentração de IGF-1 na pata, sugere-se que seu efeito anti-hiperalgésico seja explicado, pelo menos em parte, pela diminuição da ativação do IGF-1R, reduzindo a ativação da PKC α , minimizando as correntes dos canais de cálcio tipo T, diminuindo a excitabilidade dos neurônios no DRG e reduzindo a dor. Além de atuar de maneira direta reduzindo a dor via canais de cálcio, sugere-se que o efeito da LEDT 830 nm também possa ser mediado pela inibição da via PKC α , já que crescentes evidências sugerem que a PKC medeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , assim como prostaglandinas, sugerindo que o papel da PKC periférica em induzir antinocicepção envolve a inibição ou modulação de citocinas inflamatórias e prostaglandinas (JESSE et al., 2009).

No intuito de confirmar o envolvimento da LEDT na redução da hiperalgesia mecânica induzida pelo IGF-1, outro experimento foi realizado, e dessa vez o agonista do IGF-1R (IGF-1) foi injetado i.pl. nos camundongos. Os resultados desse experimento confirmaram o papel do IGF-1 no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e que aplicação da LEDT no comprimento de onda de 830 nm, mas não de 950 nm, foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica induzida pelo IGF-1. Assim, esses resultados confirmam que o efeito anti-hiperalgésico da LEDT 830 nm é mediado, pelo menos em parte, por uma inibição na sinalização do IGF-1, como descrito anteriormente.

Interessantemente, pelo fato que a LEDT 830 nm reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por injeção i.pl. de IGF-1, fato que não ocorreu no tratamento com a LEDT 950 nm, confirma que o mecanismo anti-hiperalgésico produzido por ambos os comprimentos de ondas possa ser distinto.

A partir do conjunto de resultados obtidos nesse estudo, sugere-se que o efeito anti-hiperalgésico da LEDT envolva uma complexa interação entre os sistemas aqui investigados e, provavelmente, entre outros, que

não foram abordados nesse estudo e que devem ser posteriormente investigados, como o sistema endocanabinoide e adenosinérgico e também o envolvimento de mediadores inflamatórios, como o NO, lipoxinas e resolvinas. Tomados em conjunto, os dados apresentados nesse trabalho atestam sobre o efeito anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e antioxidante da LEDT, uma vez que a terapia, mais especificamente, reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica, diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α agudamente e induziu a diminuição dos níveis de marcador de estresse oxidativo.

Cabe destacar que o efeito analgésico da LEDT não pode ser atribuído ao estresse induzido pela contenção durante o tratamento, já que o procedimento com o dispositivo desligado não afetou o limiar de sensibilidade dos animais (CIDRAL-FILHO, 2013). Assim, um sumário das diferenças encontradas entre os comprimentos de onda é mostrado na tabela 1. Diante dos efeitos aqui descritos, a LEDT se mostrou uma terapia eficaz no tratamento de quadros álgicos de etiologia inflamatória. Além disto, outros autores sugerem essa como uma terapia segura, não invasiva, de baixo custo e bem tolerada por pacientes de ambos os sexos e de todas as idades (PARK et al., 2013), não sendo encontrados relatos na literatura de efeitos colaterais, porém, requer atenção quando utilizada de modo pulsado em pacientes com epilepsia ou fotofobia (BAROLET, 2008).

Tabela 1: Diferenças entre os comprimentos de onda

Comprimento de onda	Efeitos
830 nm – 2 J/cm ²	↓ hiperalgesia mecânica; ↓ IGF-1; envolvimento sistema opioide; envolvimento mediadores mastocitários; ↓ edema; ↓ IL-1 β e TNF- α (agudo); ↓ TBARS; ↓ hiperalgesia mecânica induzida por histamina; ↓ hiperalgesia mecânica induzida por IGF-1.
950 nm – 2 J/cm ²	↓ hiperalgesia mecânica; envolvimento sistema opioide; envolvimento mediadores mastocitários; ↓ TBARS; ↑ SOD (agudo); ↓ hiperalgesia mecânica induzida por histamina.

Legenda: ↓: diminui; ↑: aumenta; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1; IL-1 β : interleucina 1 β ; TNF- α : fator de necrose tumoral alpha; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; SOD: enzima supersóxido dismutase. Fonte: elaborado pela autora, 2015.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesse estudo, conclui-se que a LEDT apresentou substancial efeito anti-hiperalgésico, assim como características anti-inflamatórias e antioxidantes em um modelo de inflamação crônica. Evidenciando que:

- a) A LEDT 830 e 950 nm reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica;
- b) A atividade anti-hiperalgésica da LEDT 830 e 950 nm envolve a ativação de receptores opioides periféricos e o recrutamento de leucócitos contendo opioides para o sítio inflamado;
- c) A LEDT 830 nm mostrou efeito anti-inflamatório, diminuindo o edema e as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α agudamente;
- d) A LEDT 830 e 950 nm demonstrou efeito antioxidante, diminuindo a concentração de marcador de estresse oxidativo e restabelecendo;
- e) A LEDT 830 nm apresentou eficácia anti-hiperalésica em modelos de hiperalgesia aguda, confirmando o envolvimento de receptores de histamina e IGF-1 no seu efeito;
- f) A LEDT 950 nm apresentou eficácia anti-hiperalésica no modelo de hiperalgesia aguda induzida por histamina;
- g) A LEDT 830 nm diminuiu a concentração de IGF-1 na pata.

Deste modo, os resultados apresentados nesse trabalho elucidam alguns dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no efeito terapêutico da LEDT e atestam a favor da sua utilização para o tratamento de quadros algícos de etiologia inflamatória. Neste sentido e devidamente fundamentada, a LEDT apresenta características que dão à terapia as evidências necessárias para sua aplicação em condições dolorosas de cunho inflamatório.

REFERÊNCIAS

ALVES, L. A. et al. Physiological Roles and Potential Therapeutic Applications of the P2X7 Receptor in Inflammation and Pain. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10953-72, 2013.

AMMAR, T. A. Monochromatic Infrared Photo Energy versus Low Level Laser Therapy in Patients with Knee Osteoarthritis. **J Lasers Med Sci**, v. 5, n. 4, p. 176-82, 2014.

ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacol Ther**, v. 133, n. 2, p. 189-204, 2012.

ARGOFF, C. Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management. **Curr Med Res Opin**, v. 27, n. 10, p. 2019-31, 2011.

BANNISTER, W. H.; BANNISTER, J. V. Factor analysis of the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal tissues and neoplastic cell lines. **Free Radic Res Commun**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 1987.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14, n. 12, p. 436-41, 1993.

BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Semin Cutan Med Surg**, v. 27, n. 4, p. 227-38, 2008.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v.1, n. 211, p. 39-50, 2012.

BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S. (Ed.). **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11^a ed. São Paulo: Manole, 2003.

BAXTER, G. A. J. **Therapeutic lasers: Theory and practice**. London: Churchill Livingstone, 1995.

BELKOUCH, M. et al. Functional up-regulation of Nav1.8 sodium channel in A β afferent fibers subjected to chronic peripheral inflammation. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 45, 2014.

BENDER, T. et al. The effect of physical therapy on beta-endorphin levels. **Eur J Appl Physiol**, v. 100, n. 4, p. 371-82, 2007.

BLAKE, D. J.; KRÖGER, S. The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? **Trends Neurosci**, v. 23, n. 3, p. 92-9, 2000.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337-48, 2011.

BOETTGER, M. K. et al. Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and NOS-deficient mice. **Eur J Pain**, v. 11, n. 7, p. 810-8, 2007.

BORSOOK, D. A Future Without Chronic Pain: Neuroscience and Clinical Research. **Cerebrum**, v. on-line, 2012.

BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: A fundamental human right. **Anesth Analg**, v. 105, n. 1, p. 205-21, 2007.

CAMPANA, V. et al. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **J Clin Laser Med Surg**, v. 16, n. 6, p. 317-20, 1998.

CARSTENS, E. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and other irritants. **J Neurophysiol**, v. 77, n. 5, p. 2499-514, 1997.

CASALECHI, H. L. et al. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 4, p. 659-65, 2009.

CATALANO, E. M.; HARDIN, K. N. **Dores crônicas**. São Paulo: Summus Editorial, 2004.

CAVANAUGH, D. J. et al. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 22, p. 9075-80, 2009.

CHEN, Y. et al. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Mol Pain**, v. 6, p. 13, 2010.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Lett**, v. 328, n. 2, p. 222-5, 2013.

CHU, Y. C. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. **Pain**, v. 119, n. 1-3, p. 113-23, 2005.

CIDRAL-FILHO, F. J. **Avaliação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos na antinocicepção induzida pela terapia por diodo emissor de luz em camundongos**. 2013. 151 f. Tese (Doutorado em Neurociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the L-arginine/nitric oxide pathway. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 2, p. 695-702, 2014.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. **Pain Med**, v. 11, n. 8, p. 1224-38, 2010.

COELHO, C. F. et al. Effectiveness of phototherapy incorporated into an exercise program for osteoarthritis of the knee: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 15, n. 221, 2014.

CORAZZA, A. V. et al. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n. 2, p. 102-106, 2007.

COSTA, J. M.; CORRAL-BAQUES, M. I.; AMAT, A. **Acupuncture: A first approach on pain relief using a 617 nm led device**. 2007, San Jose, CA.

COSTANTINO, C. M. et al. Opioid receptor heteromers in analgesia. **Expert Rev Mol Med**, v. 14, p. e9, 2012.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system to damage. **Annu Ver Neurosci**, v. 32, p. 1-32, 2009.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: **Saunders**, cap. 3, p. 50-88, 1999.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, 2005.

CUESTA-BARRIUSO, R.; GÓMEZ-CONESA, A.; LÓPEZ-PINA, J. A. Physiotherapy Treatment in Patients with Hemophilia and Chronic Ankle Arthropathy: A Systematic Review. **Rehabil Res Pract**, v. online, 2013.

CUNHA, F. Q. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukyn-4. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 1, p. 45-50, 1999.

CUNHA, J. M. et al. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. **Eur J Pharmacol**, v. 501, n. 1-3, p. 87-94, 2004.

CUNHA, T. M. et al. Role of cytokines in imediating mechanical hypernociception in a modelo of delayed-type hypersensitivity in mice. **Eur J Pain**, v. 12, n. 8, p. 1059-68, 2008.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, p. 742-780, 1997.

DA SILVA, M. D. et al. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse

Model of Peritonitis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. on-line, 2011.

DATTI, F. et al. Influence of chronic unpredictable stress on allergic responses in rats. **Physiol Behav**, v. 77, n. 1, p. 79-83, 2002.

DE MARCHI, E. et al. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases and Obesity: Role of p66Shc and Protein Kinase C. **Oxid Med Cell Longev**, v. on-line 2013.

DE MORAIS, N. C. et al. Antiinflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymozan-induced arthritis. **Photomed Laser Surg Med**, v. 28, n. 2, p. 227-32, 2010.

DESMET, K. D. et al. Clinical and experimental applications of NIRLED photobiomodulation. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 2, p. 121-8, 2006.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in diferente sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DOAK, G. J.; SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience**, v. 80, n. 3, p. 939-49, 1997.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 99-104, 1993.

DRAY, A.; URBAN, I.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol Sci**, v. 15, n. 6, p. 190-7, 1994.

ECCLESTON, C.; MORLEY, S. J.; WILLIAMS, A. C. Psychological approaches to **chronic pain** management: evidence and challenges. **Br J Anaesth**, v.111, n. 1, p. 59-63, 2013.

EELLS, J. T. et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**, v. 4, n. 5-6, p. 559-67, 2004.

ENWEMEKA, C. S. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomed Laser Surg*, v. 27, n. 3, p. 387-93, 2009.

ERDLE, B. J. et al. Effects of continuous-wave (670 nm) red light on wound healing. *Dermatol Surg*, v. 34, n. 3, p. 320-25, 2008.

ERNBERG, M. et al. Pain and allodynia/hyperalgesia induced by intramuscular injection of serotonin in patients with fibromyalgia and healthy individuals. **Pain**, v. 85, n. 1-2, p. 31-9, 2000.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 86, p. 407-21, 1990.

FANG, X. et al. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. **The Journal of Physiology**, v. 565, n. 3, p. 927-943, 2005.

FERREIRA, J. et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**, v. 117, p. 171-81, 2005.

FIDANBOYLU, M.; GRIFFITHS, L. A.; FLATTERS, S. J. Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25212, 2011.

FITZGERALD, M. et al. Near infrared light reduces oxidative stress and preserves function in CNS tissue vulnerable to secondary degeneration following partial transection of the optic nerve. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 11, p. 2107-19, 2010.

GARRY, E.M.; JONES, E.; FLEETWOOD-WALKER, S.M. Nociception in vertebrates: key receptor participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 2, p. 216-224, 2004.

GEORGE, A. et al. Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. **Exp Neurol**, v. 160, n. 1, p. 124-32, 1999.

GOMES, L. E.; DALMARCO, E. M.; ANDRE, E. S. The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expressions after low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model. **Photomed Laser Surg**, v. 30, n. 11, p. 642-7, 2012.

GRECO, M. et al. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 163, n. 3, p. 1428-34, 1989.

GRIFFIS, C. A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biol Res Nurs**, v. 7, n. 4, p. 297-312, 2006.

GURPREET, K. et al. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. **J Ethnopharmacol**, v. 108, n. 3, p. 340-8, 2006.

GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A. et al. Antioxidant Effect of Spirulina (Arthrospira) maxima on Chronic Inflammation Induced by Freund's Complete Adjuvant in Rats. **J Med Food**, 2015, in press.

HACKEL, D. et al. The Connection of Monocytes and Reactive Oxygen Species in Pain. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. e63564, 2013.

HALLIWEL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^{ed}. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HANDY, R. L. **Nitric oxide and inflammatory pain. Pain and Neurogenic Inflammation Basel**. BirkhäuserBrain SD, Moore PK, p. 81-102, 1999.

HU, S. S. et al. Effects of photodynamic therapy on the ultrastructure of glioma cells. **Biomed Environ Sci**, v. 20, n. 4, p. 269-73, 2007.

HUA, S.; CABOT, P. J. Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 9, p. 427-33, 2010.

HUANG, T. H.; LU, Y. C.; KAO, C. T. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation.

Lasers Med Sci, v. 27, n. 3, p. 621-7, 2012.

HUNG, C. J. et al. Proteomic analysis of methylarginine-containing proteins in HeLa cells by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting with a methylarginine-specific antibody. **Protein J**, v. 28, n. 3-4, p. 139-47, 2009.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Ver Neurosci**, v. 2, n. 2, p. 83-91, 2001.

HURLEY, R. W.; HAMMOND, D. L. The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. **J Neurosci**, v. 20, n. 3, p. 1249-59, 2000.

IBI, M. et al. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. **J Neurosci**, v. 28, n. 28, p. 9486-94, 2008.

IBRAHIM, M. M. et al. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci*, v. 102, n. 8, p. 3093-8, 2005.

INSTITUTE OF MEDICINE (US) Committee on Advancing Pain Research, Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research, National Academies Press, 2011.

ISHIGURO, M.; IKEDA, K.; TOMITA, K. Effect of near-infrared light-emitting diodes on nerve regeneration. **J Orthop Sci**, v. 15, n. 2, p. 2339, 2010.

JENSEN, T. S.; MADSEN, C. S.; FINNERUP, N. B. Pharmacology and treatment of neuropathic pains. **Curr Opin Neurol**, v. 22, n. 5, p. 467-74, 2009.

JESSE, C. R.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C. W. Mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of bis-selenide in mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 61, n. 5, p. 623-30, 2009.

JI, R. R.; STRICHARSTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Sci. STKE**, v. 2004, n. 252, p. re14, 2004.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001.

JURÁNEK, I. et al. Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. **Food Chem Toxicol**, v. 61, p. 240-7, 2013.

KARU, T. **Cellular mechanisms of low-power laser therapy**. In: MUELLER, G.; TUCHIN, V. V., et al, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, Moscow, p.60-66, 2002.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surg Med**, v. 36, n. 4, p. 307-14, 2005.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J Quantum Electronics**, v. 23, n. 10, p. 1703-1722, 1987.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 49, n. 1, p. 117, Mar 1999.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutr Res**, v. 34, n. 11, p. 907-29, 2014.

KEEBLE, J. E. et al. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. **Pain**, v. 141, p. 135-142, 2009.

KEEFE, F. J. et al. Psychosocial interventions for managing **pain** in older adults: outcomes and clinical implications. **Br J Anaesth**, v. 111, n. 1, p. 89-94, 2013.

KELLEY, N. E.; TEPPER, D. E. Rescue therapy for acute migraine, part 3: opioids, NSAIDs, steroids, and post-discharge medications. **Headache**, v. 52, n. 3, p. 467-82, 2012.

KHAN, S. et al. Mechanism underlying anti-hyperalgesic and anti-allodynic properties of anomalin in both acute and chronic inflammatory pain models in mice through inhibition of NF- κ B, MAPKs and CREB signaling cascades. **Eur J Pharmacol**, v. 718, n. 1-3, p. 448-58, 2013.

KHODOROVA, A. et al. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat. Med**, v. 9, n. 8, p. 1055–61, 2003.

KOCYIGIT, F. et al. Functional magnetic resonance imaging of the effects of low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation on central pain modulation: a double-blind, placebo- controlled trial. **Clin J Pain**, v. 28, n. 7, p. 581-8, 2012.

KOLAROVA, H.; DITRICHOVA, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 24, n. 3, p. 231-5, 1999.

KONTINEN, V. K.; MEERT, T. F. Vocalization responses after spinal administration of bicuculline or strychnine in rats. **Neuromodulation**, v. 5, n. 4, p. 221-30, 2002.

KRAUS, J. et al. Regulation of mu-opioid receptors by cytokines. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 1, p. 164-70, 2009.

KUMAR, V.; PERKINS, J. A. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LAM, H. H. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. **Neurosci Lett**, v. 210, n. 3, p. 201-204, 1996.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. Physiology of Pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. **Philadelphia:Saunders**, v.30, n.4, p. 703-728, 2000.

LARSSON, M. Ionotropic glutamate receptors in spinal nociceptive processing. **Mol Neurobiol**, v. 40, n. 3, p. 260-288, 2009.

LAZO, J. S.; PARKER, K. L.; BRUNTON, L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

LEANEZ, S.; HERVERA, A.; POL, O. Peripheral antinociceptive effects of um- and delta-opioid receptor agonists in NOS2 and NOS 1 knockout mice during chronic inflammatory pain. **Eur J Pharmacol**, v. 602, n. 1, p. 41-9, 2009.

LEE, Y. C. Effect and Treatment of Chronic Pain in Inflammatory Arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 5, n. 1, p. 300, 2013.

LEUNG, L.; CAHILL, C. M. TNF-alpha and neuropathic pain--a review. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 27, 2010.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-78, 1990.

LIBBY, P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. **Nutr Ver**, v. 65, n. 12, p. 140-6, 2007.

LIM, J. et al. Effects of low-level light therapy on hepatic antioxidant defense in acute and chronic diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2009.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.

LIN, W. et al. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. **Lasers Surg Méd**, v. 39, n. 7, p.614-21, 2007.

LINARDI, A. et al. Involvement of kinins, mast cells and sensory neurons in the plasma exsudation and paw edema induced by staphylococcal enterotoxin B in the mouse. **Eur J Pharmacol**, v. 399, n. 2-3, p. 235-42, 2000.

LIVINGSTON, A. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 30, n. 4, p. 773-81, 2000.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, 2008.

LOW, J. R., A. **Laserterapia**. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2001.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

MACINTYRE, P. E. et al. **Acute pain management: scientific evidence**. Australian and New Zealand College of Anesthetists and Faculty of Pain Medicine. 3ª Ed., p. 1-533, 2010.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 265-90, 2009.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization decreases hypersensitivity by activation of peripheral opioid receptors in a mouse model of postoperative pain. **Pain Med**, v. 13, n. 8, p. 1049-58, 2012.

MARTINS, D. F. et al. Pheripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. **J Neurosci Res**, v. 93, n. 1, p. 157-66, 2015.

MEINHARDT, M. Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin. **J Biomed Opt**, v. 13, n. 4, 2008.

MELIS, M.; DI GIOSIA, M.; ZAWAWI, K. H. Low level laser therapy for the treatment of temporomandibular disorders: a systematic review of the literature. **Cranio**, v. 30, n. 4, p. 304-12, 2012.

MELZACK, R.; WALL, P. D. **Textbook of Pain**. 4ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

MEOTTL, F. C. et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 12, p. 1707-13, 2006.

MESTER, E.; SZENDE, B.; GARTNER, P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. **Radiobiol Radiother (Berl)**, v. 9, n. 5, p. 621-6, 1968.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 3474-3555, 2002.

MILLER, R. et al. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. **Handb Exp Pharmacol**, n. 194, p. 417-449, 2009.

MIURA, M. et al. Peripheral sensitization caused by insulin-like growth factor 1 contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. **Pain**, v. 152, n. 4, p. 888-95, 2011.

MOFFAT, R.; ERA, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Pain**, v. 12, p. 12-15, 2011.

MOILANEN, E. Two faces of inflammation: an immunopharmacological view. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 114, n. 1, p. 2-6, 2014.

MOORE, R. A. et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Gastroprotection, and Benefit–Risk. **Pain Practice**, v. 14, n. 4, p. 378-95, 2013.

MORIARTY, O.; McGUIRE, B. E.; FINN, D. P. The effect of pain on cognitive function. A review of clinical and pre clinical research. **Prog Neurobiol**, v. 93, n. 3, p. 385-404, 2011.

MORIYAMA, Y. et al. In vivo effects of low level laser therapy on inducible nitric oxide synthase. **Lasers Surg Med**, v. 41, n. 3, p. 227-31, 2009.

MOUSA, S. A. et al. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. **J Neuroimmunol**, v. 126, n. 1-2, p. 5-15, 2002.

MOUSA, S. A. et al. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain.

Endocrinology, v. 145, n. 3, p. 1331-41, 2004.

NEUGEBAUER, V. et al. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Mol Pain**, v.3, n. 8, p. 1-13, 2007.

NIEMZ, M. H. **Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications**. 3rd ed. New York: Springer, 2007.

NIJS, J. et al. Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? **Pain Physician**, v. 15, n. 3, p. 205-13, 2012.

NOGUEIRA, T. O. **Efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão da pata: relação com a migração neutrofílica e a expressão da proteína S100A9**. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo.

NORBERG, J. K. Targeting inflammation: multiple innovative ways to reduce prostaglandin E₂. **Pharm Pat Anal**, v. 2, n. 2, p. 265-88, 2013.

NUSSBAUM, E. L.; BAXTER, G. D.; LILGE, L. A review of laser technology and light- tissue interactions as a background to therapeutic applications of low intensity lasers and other light sources. **Phys Ther Rev**, v. 8, n. 1, p. 31-44, 2003.

OBATA, H.; EISENACH, J. C.; HUSSAIN, H. et al. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. **J Pain**, v. 7, n. 11, p. 816-822, 2006.

O'KANE, S. et al. Low intensity laser irradiation inhibits tritiated thymidine incorporation in the hemopoietic cell lines HL-60 and U937. **Lasers Surg Med**, v. 14, n. 1, p. 34-9, 1994.

OLIVEIRA, S. M. et al. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. **Eur J Pharmacol**, v. 672, n. 1-3, p. 88-95, 2011.

PAPICH, M. G. Pharmacologic considerations for opiate analgesic and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 30, n. 4, p. 815-37, 2000.

PARADA, C. A. et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 937-44, 2001.

PARK, H. J.; MOON, D. E. Pharmacologic Management of Chronic Pain. **Korean J Pain**, v. 23, n. 2, p. 99-108, 2010.

PARK, K. Y. et al. The Effects of 830 nm Light-Emitting Diode Therapy on Acute Herpes Zoster Ophthalmicus: A Pilot Study. **Ann Dermatol**, v. 25, n. 2, p. 163-7, 2013.

PASSARELLA, S. et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Lett**, v. 175, n. 1, p. 95-9, 1984.

PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis, and periostitis in rats given adjuvante. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 91, n. 1, p. 95-101, 1956.

PEARSON, C. M.; WAKSMAN, B. H.; SHARP, J. T. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. **J Exp Med**, v. 113, n. 3, p. 485-509, 1961.

PIOVEZAN, A. P. et al. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitised mice. **Br J Pharmacol**, v. 141, n. 4, p. 755-63, 2004.

PIRES, A. F. **Atividade antinociceptiva de uma lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*** MART. 2007. 119 p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

RADU, B. M. et al. Neurovascular Unit in Chronic Pain. **Mediators Inflamm**, v. on-line, 2013.

RAMAMURTHY, S.; ALANMANOU, E.; ROGERS, J. N. **Decision making in pain management**. 2nd ed. New York: Mosby Year Book, 1993.

RASU, R. S. et al. Assessing Chronic Pain Treatment Practices and Evaluating Adherence to Chronic Pain Clinical Guidelines in Outpatient Practices in the United States. **J Pain**, v. 14, n. 6, p. 568-78, 2013.

REDDY, G. K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **J Clin Laser Med Surg**, v. 22, n. 2, p. 141-50, 2004.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v. 100, v. 1-2, p. 1-6, 2002.

RINGKAMP, M.; MEYER, R. A. **Physiology of Nociceptors**. In: BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, M. C. Ed(s). *Science of Pain*. 1 ed. California: Academic Press. p. 724-49, 2009.

RITTNER, H. L. et al. Opioid peptide expressing leukocytes – Identification, recruitment and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. **Anesthesiology**, v. 95, p. 500–508, 2001.

RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 6, p. 1215-22, 2005.

RITTNER, H. L.; BRACK, A.; STEIN, C. Pain and the immune system. **Br J Anaesth**, v. 101, n. 1, p. 40–44, 2008.

ROCHE, O.; RODRÍGUEZ SARMIENTO, R. M. A new class of histamine H3 receptor antagonists derived from ligand based design. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 17, n. 13, p. 3670-5, 2007.

ROELANDTS, R. The history of phototherapy: something new under the sun? **J Am Acad Dermatol**, v. 46, n. 6, p. 926-30, 2002.

ROTH, J. et al. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol Allergy Clin Neurol Clin**, v. 24, n. 3, p. 421-39, 2006.

RUBINSTEIN, S. M. et al. Spinal manipulative therapy for chronic low-back pain. *Cochrane Database Syst Rev*, n. 2, 2011.

RUEFF, A.; DRAY, A. 5-Hydroxytryptamine-induced sensitization and activation of peripheral fibers in the neonatal rat are mediated via different 5-hydroxytryptamine-receptors. *Neuroscience*, v. 50, n. 4, p. 899-905, 1992.

RUSSELL, B. A.; KELLETT, N.; REILLY, L. R. A study to determine the efficacy of combination LED light therapy (633 nm and 830 nm) in facial skin rejuvenation. *J Cosmet Laser Ther*, v. 7, n. 3-4, p. 196-200, 2005.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. *Annu Rev Med*, v. 49, p. 123-33, 1998.

SACERDOTE, P. et al. Transient early expression of TNF-alpha in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*, v. 436, n. 2, p. 210-3, 2008.

SATTAYUT, S.; HUGHES, F.; BRADLEY, P. 820 nm gallium aluminum arsenide laser modulation of prostaglandin E2 production in interleukin 1 stimulated myoblasts. *Laser Therapy*, v. 11, n. 2, p. 88-95, 1999.

SCHÄFERS, M. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci*, v. 23, n. 1, p. 2517-21, 2003.

SCHINDL, A. et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol*, v. 148, n. 2, p. 334-6, 2003.

SCHMIDTKO, A.; TEGEDER, I.; GEISSLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci*, v. 32, n. 6, p. 339-46, 2009.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, v. 5, 1062-7, 2002.

SCHUBERT, E. **Light-Emitting Diodes**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

SCHWARTZ, E. S. et al. Persistent pain is dependent on spinal mitochondrial antioxidant levels. **J Neurosci**, v. 29, n. 1, p. 159–68, 2009.

SERAFIM, K. G. et al. Effects of 940-nm light-emitting diode (LED) on sciatic nerve regeneration in rats. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 113-9, 2011.

SCHAIBLE, H. G. Pathophysiology of pain. **Orthopade**, v. 36, n. 1, p. 8-16, 2006.

SCHAIBLE, H.G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.177, n.3, p.28, 2007.

SHARMA, S. K. et al. Dose response effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons. **Lasers Surg Med**, v. 43, n. 8, p. 851-9, 2011.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIMAOKA, M. et al. Fucoidin, a potente inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbolster-induced inflammatory sites in rabbit lungs. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 1, p. 307-11, 1996.

SINGH, A.K.; VINAYAK, M. Curcumin Attenuates CFA Induced Thermal Hyperalgesia by Modulation of Antioxidant Enzymes and Down Regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-6. **Neurochem Res**, 2014, in press.

SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem J**, v. 222, n. 1, p. 1-15, 1984.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR - SBED.
Conheça mais sobre a dor. São Paulo, 2013.

SOMMER, C.; WHITE, F. **Cytokines, Chemokines, and Pain**, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, p. 279-302, 2010.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F. et al. **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press, p. 279-302, 2010.

SONG, S. et al. Low-level laser therapy regulates microglial function through Src-mediated signaling pathways: implications for neurodegenerative diseases. **J Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 219, 2012.

SORG, O. oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **C R Biol**, v. 327, n. 7, p. 649-62, 2004.

STEIN, C.; LANG, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 1, p. 3-8, 2009.

STEIN, C.; MACHELSKA, H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 4, p. 860-81, 2011.

STEMKOWSKI, P. L.; ZAMPONI, G. W. The tao of IGF-1: insulin-like growth factor receptor activation increases pain by enhancing T-type calcium channel activity. **Sci Signal**, v. 7, n. 346, p. pe23, 2014.

SWEITZER, S. M. et al. Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 309, n. 2, p. 616-25, 2004.

TAHA, R.; BLAISE, G. A. Update on the pathogenesis of complex regional pain syndrome: role of oxidative stress. **Can J Anaesth**, v. 59, n. 9, p. 875-81, 2012.

TAMADDONFARD, E. et al. Central effect of histamine in a rat model of acute trigeminal pain. **Pharmacol Rep**, v. 60, n. 2, p. 219-24, 2008.

TANSEY, M. G.; SZYMKOWSKI, D. E. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. **Drug Discov Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1082-8, 2009.

TAO, F. Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 847-854, 2003.

TIPLER, A. P. **Física: eletricidade, magnetismo, ótica**. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TRELLES, M. A.; ALLONES, I. Red light-emitting diode (LED) therapy accelerates wound healing postblepharoplasty and periocular laser ablative resurfacing. **J Cosmet Laser Ther**, v. 8, n. 1, p. 39-42, 2006.

TREVISANI, M. et al. 4Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, n. 33, p. 13519–24, 2007.

TÚNER, J. H. L. **The laser therapy handbook**. Tallinn: Prima Book, 2004.

UÇEYLER, N.; SCHÄFERS, M.; SOMMER, C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. **Exp Brain Res**, v. 196, n. 1, p. 67-78, 2009.

VACCA, R. A. et al. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser irradiation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 195, n. 2, p. 704-9, 1993.

VACCA, R. A. et al. Increase of both transcription and translation activities following separate irradiation of the in vitro system components with He-Ne laser. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 203, n. 2, p. 991-7, 1994.

VAN BUREN, J. J. et al. Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-1. **Mol Pain**, v. 1, p. 17, 2005.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev**, v. 46, n. 3, p. 295-309, 2004.

VAS, J. et al. Acupuncture in patients with acute low back pain: a multicentre randomised controlled clinical trial. **Pain**, v. 153, n. 9, p. 1883-9, 2012.

VERRI, W. A. Jr. et al. **Studies in natural products chemistry**. In: Atta-ur-Rahman, ed. p. 297–322 Elsevier, Amsterdam, 2012.

VINCK, E. et al. Evidence of changes in sural nerve conduction mediated by light emitting diode irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 20, n. 1, p. 35-40, 2005.

VINCK, E. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 95-9, 2003.

VINCK, E. et al. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: A pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. **Lasers in Medical Science**, v. 21, n. 1, p. 11-18, 2006.

WIKSTROM, M.; KRAB, K.; SARASTE, M. **Cytochrome Oxidase: A Synthesis**. Academic Press, New York, p. 61, 1981.

WILLIS, W. D. Jr. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. **Brain Research Reviews**, v. 55, n. 2, p. 297-313, 2007.

WONG-RILEY, M. T. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **J Biol Chem**, v. 208, n. 6, p. 4761-71, 2006.

WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor alpha. **Br J Pharmacol**, v. 121, n. 3, p. 417-24, 1997.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3742-44, 2010.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, n. 14, p. 7723-30, 1999.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v.55, n. 3, p. 353-364, 2007.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, 2000.

WU, J. et al. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. **Pain**, v. 94, n. 1, p. 47-58, 2001.

YONEHARA, N. et al. Nitric oxide in the rat spinal cord in Freund's adjuvant-induced hyperalgesia. **Jpn J Pharmacol**, v. 75, n. 4, p. 327-35, 1997.

YOSHIDA, A. et al. Intrathecally-administered histamine facilitates nociception through tachykinin NK1 and histamine H1 receptors: a study in histidine decarboxylase gene knockout mice. **Eur J Pharmacol**, v. 522, n. 1-3, p. 55-62, 2005.

YU, W.; CHI, L. H.; NAIM, J. O. Lanzafame RJ. Improvement of host response to sepsis by photobiomodulation. **Lasers Surg Med**, v. 21, n. 3, p. 262-8, 1997.

ZHANG, J. M.; NA, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHANG, Y. et al. Peripheral pain is enhanced by insulin-like growth factor 1 through a G protein-mediated stimulation of T-type calcium channels. **Sci Signal**, v.7, n. 346, p. ra94, 2014.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10, 1983.